



Universidad de Almería



Facultad de Ciencias Experimentales

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER EN USO SOSTENIBLE DE RECURSOS
NATURALES Y SERVICIOS ECOSISTÉMICOS

Autora: Claudia Guillén Sánchez

Diversidad Funcional de la Microbiota de la Zona
Crítica en la Llanura Costera de
Torregarcía-Amoladeras (Almería, España)

Functional Diversity of the Critical Zone Microbiota
in Torregarcía-Amoladeras Coastal Plain (Almería,
Spain)

Directora: María Jacoba Salinas Bonillo

Codirectora: María José López López

Mayo 2021

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el marco de la Plataforma LTSER "La Plataforma LTSER del Sureste Ibérico Árido - España (LTER_EU_ES_027)", el proyecto LIFE Adaptamed (LIFE14349 CCA/ES/000612), y el proyecto RTI2018-102030-B-I00 de la Universidad de Almería (PPUENTE2020/001). Las tareas de determinación microbiológica se realizaron en el laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología y Geología de la Universidad de Almería, y con el apoyo del Centro Andaluz para la Evaluación y Seguimiento del Cambio Global de la Universidad de Almería (CAESCG), gracias al cual se obtuvieron las muestras.

Agradezco en primer lugar el esfuerzo de mis directoras María Jacoba Salinas Bonillo y María José López López, ya que sin ellas el desarrollo de este trabajo no habría sido posible, todas las explicaciones y revisiones necesarias para entregarlo a tiempo; y a mis compañeros de laboratorio, en especial a María Rosa Martínez Gallardo, que me ayudaron a realizar los análisis y me apoyaron en el corto tiempo que estuve. Por último, y no menos importante, el apoyo y cariño constante de familiares y amigos que me han ayudado en todo este tiempo.

ÍNDICE

1.	Resumen y Palabras Clave.....	4
2.	Introducción.....	5
2.1.	Objetivo.....	10
3.	Material y Métodos.....	10
3.1.	Área de Estudio.....	10
3.2.	Diseño del Muestreo.....	12
3.3.	Medidas Analíticas.....	14
3.3.1.	Contenido en Materia Orgánica.....	14
3.3.2.	Actividad Metabólica: Diversidad Funcional.....	14
3.4.	Análisis Estadístico.....	17
4.	Resultados.....	17
4.1.	Patrones de Distribución de la Materia Orgánica.....	18
4.2.	Diversidad y Actividad Funcional Microbiológica: Patrones Globales.....	19
4.2.1.	Riqueza de Sustrato (SR).....	19
4.2.2.	Intensidad de la Actividad Metabólica (AWCD).....	20
4.2.3.	Biodiversidad Funcional: Índice de Shannon (H).....	20
4.2.4.	Biodiversidad Funcional: Índice de Equidad de Shannon (E).....	21
4.2.5.	Intensidad de la Actividad Metabólica por la Naturaleza de las Fuentes de Carbono (SAWCD).....	22
4.2.5.1.	Ácidos Carboxílicos.....	22
4.2.5.2.	Carbohidratos.....	23
4.2.5.3.	Aminoácidos.....	24
4.2.5.4.	Aminas.....	25
4.2.5.5.	Polímeros.....	26
4.2.5.6.	Fenólicos.....	27
4.3.	Diversidad y Actividad Funcional Microbiológica: Patrones Verticales por Puntos de Muestreo.....	28
4.3.1.	Biodiversidad Funcional.....	28
4.3.2.	Perfiles Fisiológicos.....	34
4.4.	Análisis de Correlación.....	37
5.	Discusión.....	39
5.1.	Patrón de la Materia Orgánica.....	39
5.2.	Patrones de la Actividad Metabólica.....	40
5.3.	Efectos del Cambio Climático sobre la Comunidad Microbiana de la ZC.....	43
6.	Conclusiones.....	44
7.	Bibliografía y Webgrafía.....	45
8.	Anexos.....	53

8.1.	Anexo I: Patrones de Distribución de la Materia Orgánica.....	53
8.2.	Anexo II: Diversidad y Actividad Funcional Microbiológica: Patrones Globales.....	54

1. Resumen y Palabras Clave

Resumen: El suelo es uno de los principales componentes del sistema Tierra, pero se ha identificado una zona más amplia, la zona crítica terrestre (ZC), que oscila desde el dosel vegetal hasta la zona saturada. Esta zona proporciona muchos servicios ecosistémicos, y parte son generados por la actividad de los microorganismos que habitan en ella. Sin embargo, dicha actividad se encuentra limitada por la disponibilidad de agua y nutrientes, principalmente el carbono orgánico, que disminuyen en profundidad, siendo este fenómeno más intenso en los *drylands*, donde, igualmente, la presencia de vegetación es más escasa y afecta, por tanto, a la actividad y diversidad funcional microbiana. El objetivo de este trabajo ha sido profundizar en el conocimiento de la diversidad metabólica microbiana de las zonas no saturada y saturada de la ZC en el Parque Natural Cabo de Gata-Níjar (Almería, España). Para ello, se analizaron muestras de profundidades entre 1 y 40 m de ocho puntos de muestreo en lo relativo a su contenido en materia orgánica y actividad metabólica microbiana empleando *Biolog Ecoplates*. Los resultados demostraron un patrón claro en “V” (disminución en la zona no saturada e incremento en las partes más profundas de la saturada) en la mayoría de variables con la profundidad, lo que estuvo relacionado con la presencia de arcillas; así como importantes diferencias entre las zonas no saturada y saturada. Esos materiales menos porosos retienen mejor la materia orgánica, originando por tanto esa distribución de los parámetros a lo largo de la ZC, pero también influye en algunos casos la presencia de agua en las zonas más profundas, que cohesiona nichos. Sin embargo, estos resultados podrían cambiar debido a los efectos del cambio climático, ya que las comunidades microbianas son muy sensibles a los cambios térmicos.

Palabras Clave: Acuífero, Biodiversidad microbiana, Ecosistema árido, Microorganismos, Nivel freático, Suelo, Zona no saturada (zona vadosa), Zona saturada.

Abstract: Soil is one of the main components of the Earth system, but a wider zone has been discovered, the Earth’s critical zone (CZ), that goes from plant canopy to saturated zone. It gives lots of ecosystem services and part of them are generated by microorganisms’ activity that live on it. However, that activity is limited by water availability and nutrients, mainly organic carbon, that decrease in depth. This phenomenon is more intense in drylands where the presence of vegetation is short and, therefore, affects microbial activity and functional diversity. The main goal of this study is to deepen the knowledge of unsaturated and saturated zones microbial metabolic diversity in the Parque Natural Cabo de Gata-Níjar (Almería, Spain) CZ. In order to do it, samples between 1 and 40 m depth were analysed in eight sampling points regarding organic material content and microbial metabolic activity by using *Biolog Ecoplates*. The results demonstrated a clear “V” pattern (decrease in unsaturated zone and increase in the deeper parts of the saturated zone) with depth in most of the parameters, in fact, that increase in depth was in the presence of clay; and also important differences between unsaturated and saturated zones were demonstrated. Those less porous materials are better organic material containers, therefore, they give rise to that parameter distribution throughout CZ, although the presence of water in deeper zones affects that distribution too, because it unites niches. Nevertheless, these results could change over time due to climate change effects, because microbial communities are very sensitive to thermal changes.

Key Words: Aquifer, Arid ecosystem, Microbial diversity, Microorganisms, Saturated zone, Soil, Unsaturated zone (vadose zone), Water table.

2. Introducción

El suelo es uno de los principales componentes del sistema Tierra, y es el resultado de la interacción de varios factores: clima, organismos y topografía, entre otros (Coleman *et al.*, 2018). Son muchas y diversas las características que hacen a un suelo apto para el desarrollo de la vida, destacando el contenido de materia orgánica, textura, o estructura (Coleman *et al.*, 2018). Según el tipo de suelo y lo alterado que se encuentre, la biodiversidad que habita variará (Fierer, 2017), es decir, un suelo poco desarrollado o altamente alterado presentará una menor biodiversidad, mientras que uno que esté más evolucionado, permitirá un mejor desarrollo de vegetación, favoreciendo la existencia de individuos de mayor tamaño y, como consecuencia, contará con una mayor biodiversidad a escala microscópica.

La biodiversidad del suelo se define como “la variedad de vida bajo el suelo, desde genes y especies hasta las comunidades que forman, así como los complejos ecológicos a los que contribuyen y a los que pertenecen, desde los microhábitats del suelo hasta grandes paisajes” (FAO *et al.*, 2020). Los suelos son uno de los mayores reservorios de biodiversidad conocidos (Bardgett y Van der Putten, 2014), estimándose que un sólo gramo de suelo puede contener millones de microorganismos y, si presentan variedad de nichos ecológicos, contarán con una diferenciación funcional significativa de organismos edáficos (Torsvik y Ovreas, 2002; Bardgett y Van der Putten, 2014).

Más allá del suelo, se ha identificado una zona más amplia: la zona crítica terrestre (ZC), que se define como “aquella zona heterogénea donde las interacciones complejas entre roca, suelo, agua, aire y organismos vivos regulan la disponibilidad de recursos sustentadores de vida” (NRC, 2001); se podría decir que este concepto expande el enfoque tradicional de procesos ecológicos y patrones espaciales desde el ambiente cercano a toda la superficie terrestre (Field *et al.*, 2015). Se le da el nombre de “crítica” porque de ella depende la vida, que se desarrolla en sus estructuras y funciones, las cuales están afectadas por la intensidad con que las actividades antrópicas la están transformando (Vitousek *et al.*, 1997). Además, su evolución y desarrollo estructural resulta de las complejas interacciones entre procesos biológicos, físicos y químicos (Brantley *et al.*, 2006). Entender esas interacciones supone un reto científico enorme, así como la cadena de impactos antropogénicos que ocurren entre todos los componentes de la ZC (Banwart *et al.*, 2013).

No se considera un marco conceptual, sino un enfoque integrado para el estudio de todas las interacciones entre roca, suelo, agua, biota y atmósfera que tienen lugar en el entorno de la superficie terrestre (Phillips, *et al.*, 2019). En la Figura 1 se observa su extensión: desde el dosel de la vegetación, a través del suelo, incluyendo el lecho rocoso insaturado y saturado, aunque aún no se ha definido un límite inferior concreto (Akob y Küsel, 2011). Lo más destacado de esta zona es la gran diversidad de hábitats, y que alberga la mayoría de los microorganismos de la Tierra: procariotas (*Bacteria* y *Archaea*), eucariotas (hongos, algas y protozoos) y virus (Whitman *et al.*, 1998; Akob y Küsel, 2011). A largo plazo, el funcionamiento de la ZC está apoyado por la riqueza en biodiversidad, no sólo de organismos, sino también de suelos y sedimentos, acuíferos dinámicos y profundos, y reacciones de meteorización biogeoquímica (Richter y Billings, 2015).

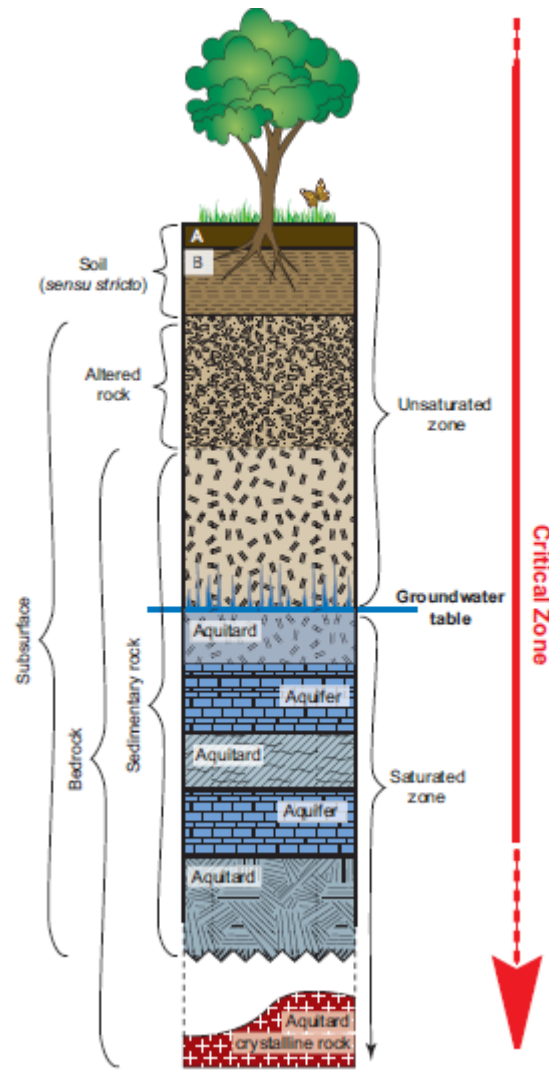


Figura 1. Extensión de la zona crítica terrestre. Fuente: Akob y Küsel (2011).

La ZC aporta muchos servicios, entre los que destacan: la conversión de minerales y nutrientes de formas líticas no disponibles a formas biológicas disponibles, el secuestro de carbono inducido por la vegetación, y la atenuación de inundaciones y contaminantes (Banwart *et al.*, 2013). Este enfoque de servicios derivados de los procesos de la ZC proporcionan un contexto más amplio, dado que son sensibles a cómo las variaciones climáticas y litológicas afectan a la evolución a largo plazo del suelo (Field *et al.*, 2015). Los servicios de la ZC deben derivarse de procesos bióticos y geológicos a lo largo de la profundidad explorada por las aguas subterráneas de libre circulación (Field *et al.*, 2015). Por tanto, y según Field *et al.* (2015), la velocidad a la que la sociedad se puede beneficiar de los servicios suministrados depende de los procesos de la ZC que limitan dicha velocidad, que suelen ocurrir a escala geológica (miles de millones de años) más que a escala ecológica (decenas a cientos de años) y, además, a grandes profundidades (cientos de metros). Es por esta razón por la que los servicios de la ZC requieren ser considerados a escalas temporales cortas y largas en relación con la gestión humana (Vitousek *et al.*, 2004).

Parte de los servicios de la ZC son generados por microorganismos, que son abundantes y ubicuos, es decir, se encuentran en cualquier lugar del planeta Tierra, no sólo en el suelo, ya que incluso llegan a las capas más altas de la atmósfera (Barberán *et al.*, 2015). En la ZC son responsables del movimiento de la información genética (Zhu *et al.*, 2017). Sin embargo, su

distribución espacial se encuentra limitada del mismo modo que la de los macroorganismos (Nemergut *et al.*, 2011). De todos los microorganismos que existen, las bacterias y hongos del suelo siguen siendo una gran mayoría invisible y desconocida, por lo que se denominan “materia oscura” de la Tierra (Jansson y Prosser, 2013), por equivalencia a la del Universo y al reto que representa su conocimiento. Sin ellos, los ecosistemas no se pueden crear o llegar a funcionar (Bashan y Bashan, 2010; Makhalanyane *et al.*, 2015).

En la ZC ocurren dos tipos de procesos esenciales para la vida de los microorganismos: geológicos y biológicos, unificados por el transporte de fluidos, con el agua transfiriendo energía y masa de forma multidireccional (Lin, 2010; Phillips, *et al.*, 2019). Los primeros meteorizan la roca, y los segundos están relacionados con la producción y consumo de energía (Jin *et al.*, 2010; Lin, 2010). Según Rasmussen *et al.* (2010), los potenciales energéticos y flujos clave que impulsan la formación de la ZC son: (1) el flujo de energía procedente de la radiación solar, que es la fuente dominante, (2) el balance de la masa de agua, (3) el balance de la masa de carbono, y (4) la denudación física y química del paisaje.

La microbiota del suelo ha sido la más estudiada hasta la fecha. Dentro del perfil del suelo se dan gradientes ambientales en los que se identifican hábitats con distintas condiciones físico-químicas; por tanto, se espera que ocurran cambios en las comunidades microbianas (Wu *et al.*, 2019). Se ha visto, además, que existen asociaciones entre la composición y abundancia de la comunidad microbiana con las variables bióticas y abióticas (FAO *et al.*, 2020). De manera general, la biomasa y diversidad de la microbiota del suelo disminuye con la profundidad (Eilers *et al.*, 2012; Stone *et al.*, 2014; Seuradje *et al.*, 2017), ya que la humedad y el carbono orgánico del suelo son los principales impulsores de muchas funciones microbianas (i. e. respiración basal) (FAO *et al.*, 2020). El agua, además, funciona como medio de transporte de solutos, energía y sedimentos a lo largo de la ZC (Wymore *et al.*, 2017); llegan incluso a existir modelos que indican que el fraccionamiento y el tiempo de residencia del agua en la ZC es muy variable en el espacio y en el tiempo (Brooks *et al.*, 2015; Evaristo y McDonnell, 2017). Esto hay que tenerlo en cuenta especialmente en zonas bajo condiciones climáticas donde escasea este recurso y en las que además se suman las perturbaciones antrópicas, que son más severas en ese tipo de regiones. Dichas perturbaciones ejercen presiones sobre la ZC que cambian la estabilidad a largo plazo de su composición y funcionamiento (FAO *et al.*, 2020).

Con el objetivo de entender mejor cómo funciona la ZC, se necesitan enfoques de distintas disciplinas como edafología, hidrología, microbiología, geología y muchas otras (Anderson *et al.*, 2008; Brantley *et al.*, 2016). Además, la escala espacio-temporal presenta una variación tan grande que no es posible que sea estudiada por unos pocos científicos y en una zona concreta. Es por ello por lo que se han desarrollado Observatorios de Zona Crítica, lugares que permiten entender esos complejos sistemas, mediante la labor de múltiples comunidades científicas interdisciplinarias (Anderson *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2011; Bernasconi, 2014; Brantley *et al.*, 2016). En estos contextos los microorganismos pueden jugar un papel importante como bioindicadores de calidad ambiental debido a su rápida reacción ante cambios adversos, por muy pequeños que sean (Gryta *et al.*, 2014).

Los efectos del cambio global derivados de las perturbaciones humanas, y más concretamente los cambios de uso del suelo (eliminación de vegetación natural para agricultura, pastos, zonas urbanas o industriales), generan, además de la simplificación del sistema, alteraciones dramáticas en los tipos de vegetación de un ecosistema, en los atributos microbianos (Cardinale *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2013; Allan *et al.*, 2015) y, como consecuencia, en la biodiversidad del subsuelo y las funciones ecosistémicas (Yang *et al.*, 2021). Se ha

encontrado que dichas funciones se empobrecen con la pérdida de biodiversidad (Tilman *et al.*, 2014; Meyer *et al.*, 2018), debido a la estrecha relación entre biodiversidad microbiana y funciones ecosistémicas (Yang *et al.*, 2021).

La pérdida de biodiversidad hace que las funciones especializadas de la ZC sean más vulnerables, ya que estas se encuentran reguladas por grupos particulares de organismos vivos, que son los que primero desaparecen o se reducen tras una alteración, a diferencia de las funciones amplias (i. e. descomposición, Delgado-Baquerizo *et al.*, 2016) que están impulsadas por cualquier organismo vivo (Yang *et al.*, 2021). Además, los impactos que sufre la ZC debido a la acción humana son transmitidos tanto horizontal (cuencas hidrográficas) como verticalmente (acuíferos) (Zhu *et al.*, 2017).

Para obtener una información completa de los impactos que tendrán los cambios ambientales sobre los microorganismos y viceversa, es necesario incorporar datos genómicos o metagenómicos (Zhu *et al.*, 2017). Actualmente, el desarrollo de las tecnologías "ómicas" (genómica, proteómica, metabolómica), basadas en técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos de bajo coste y alto rendimiento y en los avances para estudiar otras macromoléculas biológicas (proteínas y metabolitos), se presentan como técnicas prometedoras para producir datos "meta-ómicos" que abarcan todos los microorganismos de un ecosistema, y proporcionar una visión de la ecología microbiana que no puede lograrse con los métodos tradicionales (Jansson y Prosser, 2013).

Dichos impactos serán más acentuados y generarán un mayor nivel de degradación ambiental (Lan *et al.*, 2021) en los llamados *drylands*, término que corresponde a zonas de ambientes secos, semiáridos, áridos, e hiperáridos, que cubren más del 40% de la superficie terrestre del planeta (Adeel *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2007). Sus climas se caracterizan por presentar largos períodos de sequía y alta variación térmica, y por fuertes cambios estacionales en la cobertura vegetal y en la entrada de materia orgánica (Pasternak *et al.*, 2013), presentando suelos con bajo contenido de carbono orgánico y nitrógeno, que además, disminuyen con la profundidad (Gao *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2014). Estas características hacen que existan profundos impactos sobre las comunidades microbianas del suelo. Según Pasternak *et al.* (2013), las variaciones temporales, el cambio climático y los gradientes de precipitación de este tipo de zonas alteran la diversidad bacteriana y la composición de la comunidad; de un modo similar, el cambio estacional mencionado en la vegetación genera cambios en los microorganismos edáficos.

La singular distribución en parches, o dispersa, de los matorrales semiáridos es una de las características de estos ecosistemas por la que dichas formaciones vegetales contribuyen a la acumulación de materia orgánica y a un balance de agua positivo bajo su dosel (Berg y Steinberger, 2008). Al ser estos los principales factores limitantes en este tipo de ecosistemas, cabe esperar que tanto la abundancia como la actividad metabólica de los microorganismos sea mayor en las zonas con la vegetación de mayor porte. De hecho, ese tipo de distribución determina la existencia de las denominadas "islas de recursos", que se caracterizan por una disposición espacial parcheada en la que un solo arbusto o unos pocos arbustos cambian significativamente el ambiente al acumular recursos vegetales en su entorno, mejorando así las condiciones para el establecimiento y crecimiento de otras especies de plantas (García *et al.*, 2018). Estos sistemas presentan una elevada capacidad de retención de agua, bajos ratios de evaporación, acumulan nutrientes por descomposición de materia orgánica, y otras sustancias por exudación radical (Zak *et al.*, 1995; García *et al.*, 2018), haciéndolos, por tanto, un componente esencial en ambientes áridos y semiáridos para los microorganismos de la ZC.

Además, un estudio realizado por Lan *et al.* (2021), revela que la cobertura vegetal afecta significativamente a la diversidad bacteriana, en paralelo a la mayor cantidad de carbono orgánico y nitrógeno de suelos cubiertos por matorrales. García *et al.* (2018) señalan que la actividad metabólica del suelo se incrementa en las islas de recursos con mayor riqueza vegetal, acompañada también de variaciones en las propiedades del suelo. En ese mismo estudio se observa que en las islas de recursos donde el contenido de materia orgánica es menor se metabolizan preferentemente los carbohidratos simples y los ácidos carboxílicos más que los grupos más complejos (aminas, amidas, polímeros); esto indica que la comunidad microbiana muestra una mayor capacidad para metabolizar diferentes sustratos de carbono en suelos con más materia orgánica.

Se han realizado otros estudios para conocer el papel de la microbiota del suelo en este tipo de ambientes áridos (Jia *et al.*, 2010; Ben-David *et al.*, 2011; Bachar *et al.*, 2012), que indican que la comunidad microbiana y sus transformaciones biogeoquímicas asociadas pueden reflejar la distribución dispersa de los matorrales (Bachar *et al.*, 2012). Además, en zonas semiáridas mediterráneas (Goberna *et al.*, 2007), los parches de vegetación mejoran los procesos impulsados por la microbiota, mostrando un boom de actividad microbiológica bajo los matorrales (Bachar *et al.*, 2012). En estas zonas, los gradientes ambientales generados por la vegetación muestran una correlación positiva con la abundancia y diversidad microbiana (Bachar *et al.*, 2012). Dicha vegetación tiene un efecto favorable con la calidad del suelo, la presencia de carbono orgánico y nitrógeno, y promueve la actividad y biomasa microbiana (Jia *et al.*, 2010). Además, se muestra una relación positiva entre los microorganismos del suelo, la biomasa vegetal, y el contenido de carbono y nitrógeno, indicando esto que un aumento en la materia orgánica conlleva a una mayor biomasa microbiana en el suelo con el paso del tiempo (Jia *et al.*, 2010).

A pesar de todo, si bien es cierto que existen muchos estudios sobre la diversidad funcional y el papel de la microbiota del suelo en zonas áridas, se ha prestado escasa atención a la estructura y función de la comunidad microbiana incorporando el enfoque integrado de ZC, es decir, yendo más allá del suelo, y extendiendo el análisis a las zonas no saturada y saturada de la ZC. Una aproximación con esta perspectiva fue realizada por Contreras (2020), que estudió la diversidad microbiana de las zonas no saturada y saturada en un ecosistema semiárido mediterráneo del sureste ibérico dominado el arbusto arborecente *Ziziphus lotus* (L.) Lam. en una matriz de matorral bajo. Sus principales hallazgos fueron que (1) la población bacteriana es más abundante en las zonas cercanas a *Z. lotus* que aquellas más lejanas a dicha especie, (2) el patrón de distribución vertical de las comunidades microbianas está más determinado por la estructura y composición de las distintas capas del perfil geológico del subsuelo que por la influencia de *Z. lotus*, y (3) *Z. lotus* tiene una influencia favorable sobre la biodiversidad funcional y el balance de actividades metabólicas microbianas.

El trabajo de Contreras (2020) se realizó en el marco del proyecto ADAPTAMED (LIFE14 CCA/ES/000612, <https://www.lifeadaptamed.eu/>) liderado por la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Sostenible de la Junta de Andalucía, y en el que participa la Universidad de Almería, a través del Centro Andaluz para la Evaluación y Seguimiento del Cambio Global (CAESCG), junto a la Universidad de Granada y la Estación Biológica de Doñana (CSIC). Los objetivos principales del Life ADAPTAMED han sido integrar en la gestión de los ecosistemas estrategias para la adaptación y mitigación del cambio global, maximizando la provisión de servicios ecosistémicos, tales como el secuestro de carbono y mantenimiento del ciclo hidrológico, la retención y formación de suelos, producción primaria, o la polinización y dispersión de semillas. El proyecto abarca una serie de acciones sobre

ambientes representativos de la región Mediterránea (matorrales mediterráneos, predesérticos, y de alta montaña; y pinares y bosques de quercíneas), siguiendo un enfoque de gestión adaptativa que permita evaluar los efectos de dichas acciones. En el Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar, uno de los ecosistemas sobre los que se ha actuado es el azufaifar (Matorrales arborescentes de *Ziziphus lotus*, hábitat prioritario 5220* de la Directiva Hábitat), que ha sido identificado como “ecosistema dependiente de aguas subterráneas” (Guirado *et al.*, 2018), y que representa una prioridad para la conservación de la biodiversidad en Europa (Tirado, 2009). Mientras que el trabajo de Contreras (2020) se centró en el análisis microbiológico de dos de las ocho estaciones de muestreo existentes en este ecosistema, fruto de las acciones del Life ADAPTAMED, en este trabajo hemos extendido el análisis a todas las estaciones. Seguir avanzando en el conocimiento del papel de la microbiota en la ZC de una zona mediterránea árida proporcionará claves que ayudarán a disponer de una perspectiva más global para llevar a cabo una gestión del ecosistema en un escenario cambiante como el actual.

2.1. Objetivo

El objetivo general de este estudio ha sido profundizar en el conocimiento de la diversidad metabólica o funcional de los microorganismos de las zonas no saturada (o zona vadosa) y saturada, como base para identificar las funciones y servicios que provee la biodiversidad de la zona crítica en un área bajo condiciones mediterráneas áridas.

Partiendo de ese objetivo, se establece la siguiente hipótesis: la diversidad funcional microbiana de las zonas no saturada y saturada de la ZC estará asociada a la heterogeneidad espacial vertical, manifestándose diferencias entre ambas. Se esperan cambios funcionales y disminución de la actividad metabólica en profundidad por la reducción de recursos y la modificación del nivel de complejidad del hábitat y de las condiciones ambientales, aspectos modelados por la variabilidad de factores como el tamaño de los poros, la temperatura, el agua, el oxígeno, los nutrientes y la naturaleza de las fuentes de energía. Además, debido a las condiciones climáticas áridas de la zona de estudio, se esperará una mayor separación de nichos y diversidad de hábitats, sobre todo en la zona no saturada, esencialmente porque el agua, principal factor para conectar los poros y controlar el movimiento de los organismos, es un recurso escaso (Akob y Küsel, 2011).

3. Material y Métodos

3.1. Área de Estudio

El trabajo fue realizado en la llanura costera del Parque Natural Cabo de Gata-Níjar (Figura 2), situado al sureste de la Península Ibérica, en la provincia de Almería (36° 49' 20" N, 2° 16' 50" W) en el año 2021, aunque en los años 2018 y 2019 se hizo la perforación sobre los puntos de muestreo, como se explicará a continuación. La zona destaca por su clima: semiárido mediterráneo con inviernos suaves y húmedos, y veranos cálidos y secos; con una temperatura media anual que ronda los 18,5 °C y precipitaciones que no suelen alcanzar los 200 mm anuales [Datos de la Agencia Española de Meteorología (www.aemet.es), estación meteorológica Almería Aeropuerto].

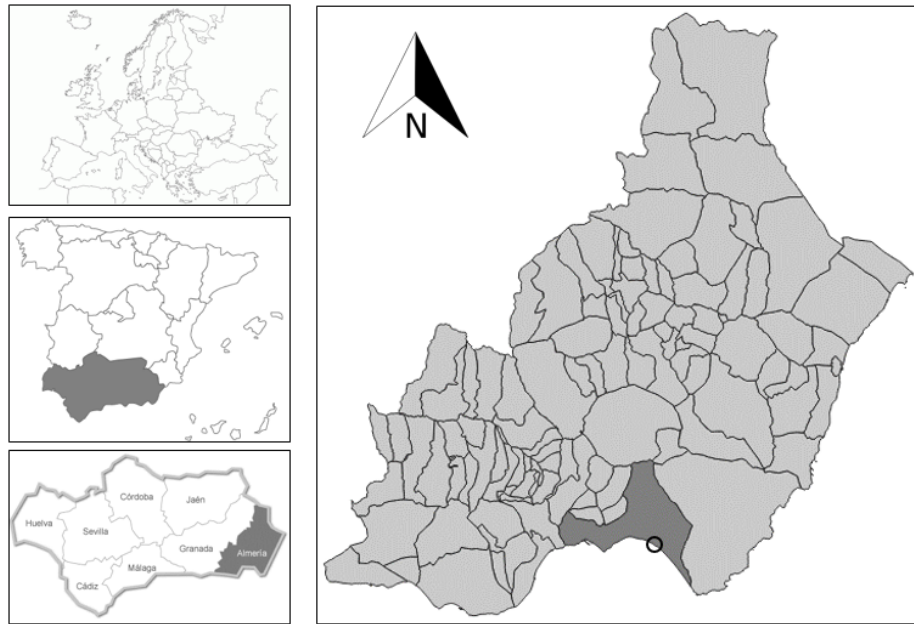


Figura 2. Localización en círculo negro de la zona de estudio. Fuente: Elaboración propia.

El clima existente condiciona el tipo de vegetación que hay: el Parque es una de las pocas zonas de Europa que tiene azufafifos (*Z. lotus*). Esta especie es capaz de tolerar la sequía (es una especie ‘*stress tolerant*’) alcanzando las masas de agua subterráneas (Torres-García *et al.*, 2021), denominándose freatófitas (Meinzer, 1927). Esto se convierte en un problema cuando interviene el ser humano en las extracciones de dicha fuente, siendo además el acuífero que hay en la zona de estudio recargado, principalmente, por el agua de la precipitación.

La redistribución hidráulica de los freatófitos es una estrategia que beneficia a especies de sotobosque (Scott *et al.*, 2008). Esta técnica consiste en elevar el agua de las regiones más profundas y húmedas del suelo hasta las más superficiales y secas, mejorando la disponibilidad de nutrientes y manteniendo el balance de agua y carbono en el ecosistema (Cardon *et al.*, 2013; Hultine *et al.*, 2020). Por tanto, *Z. lotus* se comporta como una especie ingeniera clave del ecosistema (Guirado *et al.*, 2018), afectada negativamente tanto por la aridificación cada vez mayor por los efectos del calentamiento global, como por la sobreexplotación ya mencionada del acuífero del que extrae el agua (Torres-García *et al.*, 2021).

En la Figura 3, donde además se observan los puntos de muestreo, se muestra la distribución en parches de *Ziziphus lotus*, siendo estos los puntos dispersos dentro del área.

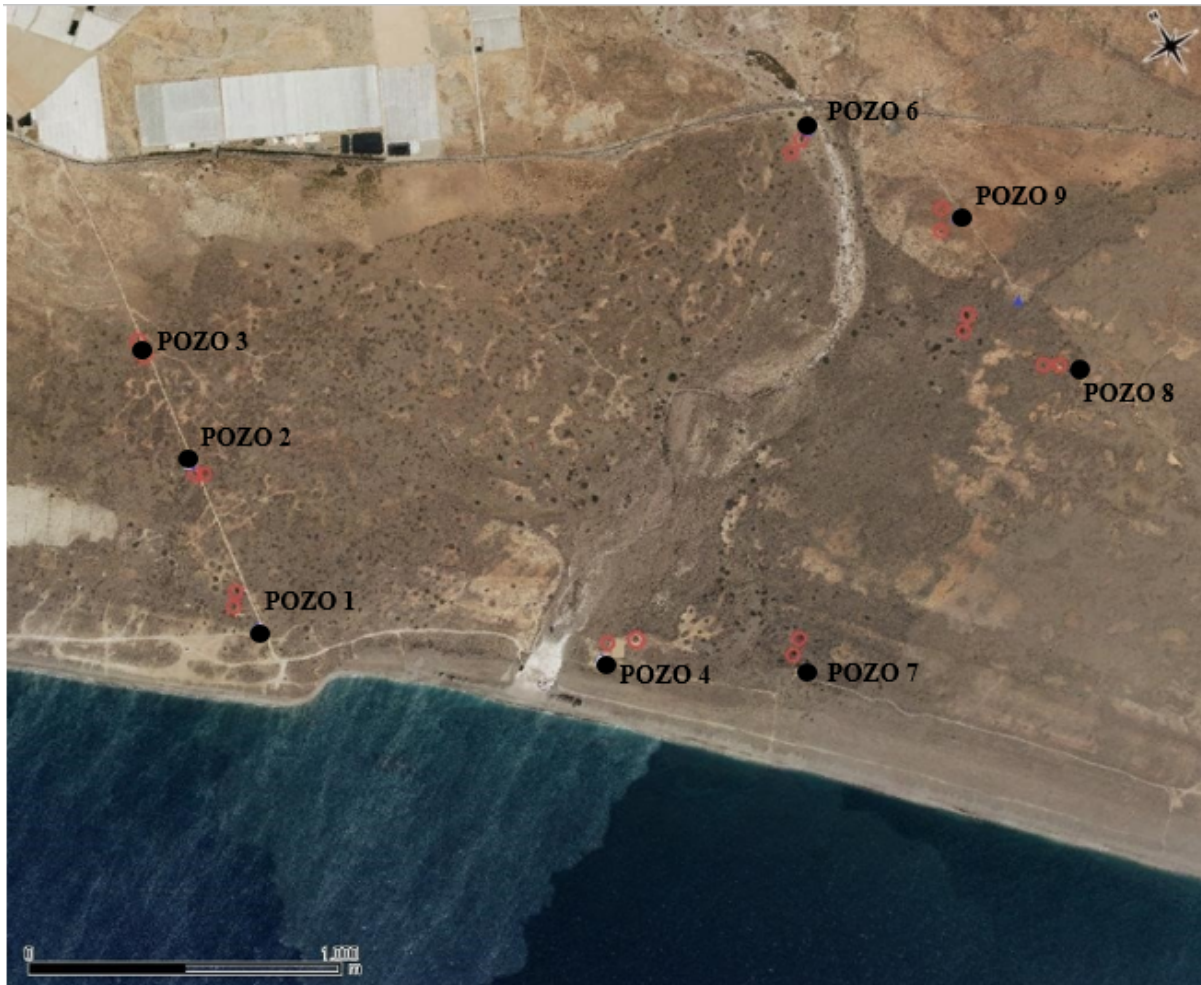


Figura 3. Distribución espacial de los puntos de muestreo dentro la red de pozos ADAPTAMED para el seguimiento del agua subterránea en la llanura litoral de Torregarcía-Amoladeras (Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar). Fuente: CAESCG.

3.2. Diseño del Muestreo

Las muestras fueron recogidas a partir de los materiales extraídos durante la perforación de ocho pozos ubicados en el área de estudio (Figura 3). Los puntos de muestreo 1, 2, 3 y 6 se encuentran al Oeste de la rambla de las Amoladeras, mientras que el resto (4, 7, 8 y 9) están al Este. Los puntos de muestreo 4 y 6 se localizan en las orillas de la rambla. La profundidad del nivel freático varía entre 2,8 m del punto 4 y 25,7 m del 2 (Tabla 1), siendo los puntos de muestreo más cercanos al mar (1, 4 y 7) donde menos profunda se encuentra el agua del acuífero.

Tabla 1. Profundidades de las muestras analizadas.

P	PROFUNDIDADES (m)									Prof Perf	Prof Ent	Prof R P	Prof A
										(m)	(m)	(m)	(m)*
1	1	5	10	15	20	25	--	--	--	--	--	25	9,1
2	1	5	10	15	20	25	30	34	--	38	38	33	19,8
3	1	5	10	15	20	25	30	35	40	117	42	40	25,7
4	1	5	10	15	20	25	27	--	--	27	24	16,5	2,8
6	1	5	10	15	20	25	30	35	--	36	36	29	14,5
7	1	5	10	15	--	--	--	--	--	--	33	26	7,8
8	1	5	10	15	20	25	27	--	--	33	33	28	12,1
9	1	5	10	15	20	25	30	35	40	51	48	44	25,5

P: Punto de muestreo; Prof Perf: Profundidad perforada; Prof Ent: Profundidad entubada; Prof R P; Profundidad real del punto de muestreo; Prof A: Profundidad del agua, correspondiente al nivel freático.

*La profundidad del agua indica en cada caso la separación entre la zona no saturada y la zona saturada.

Los pozos fueron perforados a través del sistema de rotopercusión hidráulica. De los materiales extraídos y dispuestos en superficie se recogió una muestra por metro perforado. Para los análisis realizados en este trabajo se seleccionaron muestras de, mínimo, 4 profundidades en cada uno de los puntos de muestreo, cada 5 metros de profundidad (Tabla 1). Dada la importancia de la abundancia y tamaño de los poros para la microbiota de la ZC (Akob y Küsel, 2011), los materiales se clasificaron según su porosidad (Tabla 2) en arcillas, arenas y gravas; los materiales compactados y duros se denominaron genéricamente “roca”, incluyéndose aquí tanto al “caliche” o costra caliza edáfica cuaternaria, muy frecuente en la zona de estudio, como a otros materiales más profundos.

Tabla 2. Potencia (m) de los materiales extraídos en cada punto de muestreo. Los materiales se clasificaron según su porosidad en arcillas, arenas, gravas; a los compactados y duros se les denominó “roca”.

Pozo	Roca	Arcillas	Arenas	Roca	Gravas	Arcillas
1	0-3	--	3-27	--	--	27-
2	0-3	--	3-26	--	--	26-
3	0-2	--	2-27	27-31	--	31-
4	0-6	--	6-27	--	--	--
6	--	--	0-13	--	13-21	21-
7	--	--	0-12	--	12-33	33-
8	0-3	3-10	10-14	--	--	14-
9	0-3	3-16	16-30	--	--	30-

Las muestras fueron recogidas en frascos estériles de 100 mL, transportadas al laboratorio y conservadas congeladas (-20 °C) hasta su análisis.

Para cada una de las muestras se analizaron el contenido en materia orgánica y la biodiversidad funcional (actividad metabólica), tal y como se describe en los siguientes apartados. Todos los análisis que se describen a continuación se efectuaron en muestras descongeladas durante 24 h a 4 °C. Para ambas variables se emplearon tres réplicas por muestra.

3.3. Medidas Analíticas

3.3.1. Contenido en Materia Orgánica

El análisis del contenido en materia orgánica de las muestras se llevó a cabo empleando métodos gravimétricos (Figura 4). Se pesó 1 g de cada muestra, que se incorporó en crisol tarado, para llevarlo a desecación en estufa a 105 °C, con el objetivo de eliminar la humedad de la muestra. Tras desecación, las muestras se pesaron y se calcinaron en horno mufla a 550 °C durante 3,5 horas, para ser posteriormente pesadas una vez enfriadas. El contenido en materia orgánica se calculó restando el peso inicial y el final, y se expresó como porcentaje en peso seco de la muestra.

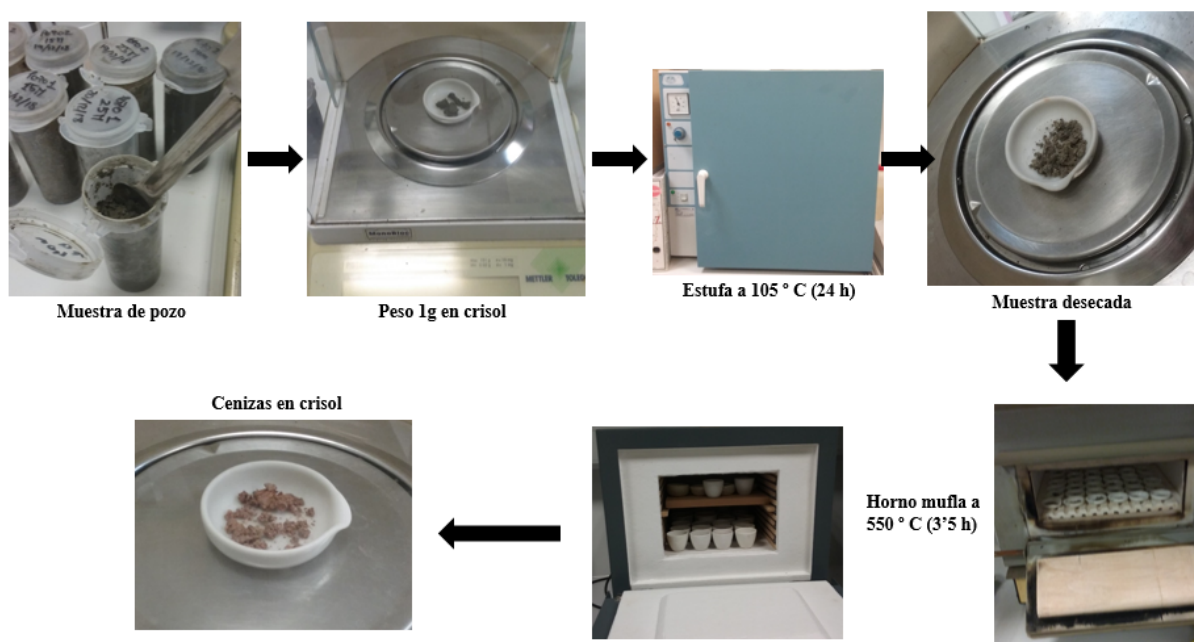


Figura 4. Método de análisis del contenido en materia orgánica de las muestras. Fuente: Elaboración propia.

3.3.2. Actividad Metabólica: Diversidad Funcional

Para evaluar la diversidad metabólica de las poblaciones microbianas presentes en las distintas muestras, se emplearon *Biolog Ecoplates™*, que fueron diseñadas para el análisis de la comunidad y la ecología microbiana, y permiten obtener el perfil fisiológico a nivel de comunidad (Gryta *et al.*, 2014; Feigl *et al.*, 2017). Consisten en microplacas con 96 pocillos constituidos por 3 paneles replicados que contienen 31 fuentes de carbono (Figura 5), las cuales se agrupan en 6 categorías en función del tipo de fuente carbonada (aminoácidos, aminas, carbohidratos, ácidos carboxílicos, compuestos fenólicos y polímeros). Uno de los pocillos es un control que no contiene sustrato carbonado (agua). Los sustratos carbonados están ligados a un colorante, de modo que la metabolización del sustrato particular por parte de una determinada comunidad microbiana se visualiza mediante la aparición de una coloración azul (Figura 5), cuya intensidad está relacionada directamente con la intensidad de

la actividad metabólica frente a dicho sustrato (Contreras, 2020). Es importante destacar que esta técnica sólo permite conocer las bacterias heterótrofas que son metabólicamente activas.

A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine
H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

Figura 5. *Biolog Ecoplates™* con 31 sustratos y las tres repeticiones. Fuente: Elaboración propia.

Las microplacas se siembran con una suspensión obtenida a partir de la muestra a evaluar. Todos los materiales necesarios para dicha siembra, mostrados en la Figura 6, se esterilizaron previamente mediante autoclave, a 121 °C y 1 bar de presión durante 20 minutos. Además, las muestras se procesaron en condiciones asépticas, siempre en presencia del mechero Bunsen (Figura 6) que permitía mantener las condiciones de esterilidad.

Para obtener la suspensión de la muestra se pesó 1 g de la misma en papel de filtro estéril y se incorporó en un tubo de ensayo con 9 mL de solución salina estéril (NaCl 0,9% p/v), correspondiente a la primera dilución (10^{-1}). Esta se mantuvo en agitación en vórtex (marca RSLAB-6PRO) durante dos minutos. A partir de dicha dilución se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina estéril hasta obtener la dilución 10^{-3} , que se empleó para la siembra de las microplacas. En cada pocillo de la *Biolog Ecoplate™* se incorporaron 150 µL empleando una pipeta multicanal. Las microplacas inoculadas se incubaron a 25 °C durante 72 horas.

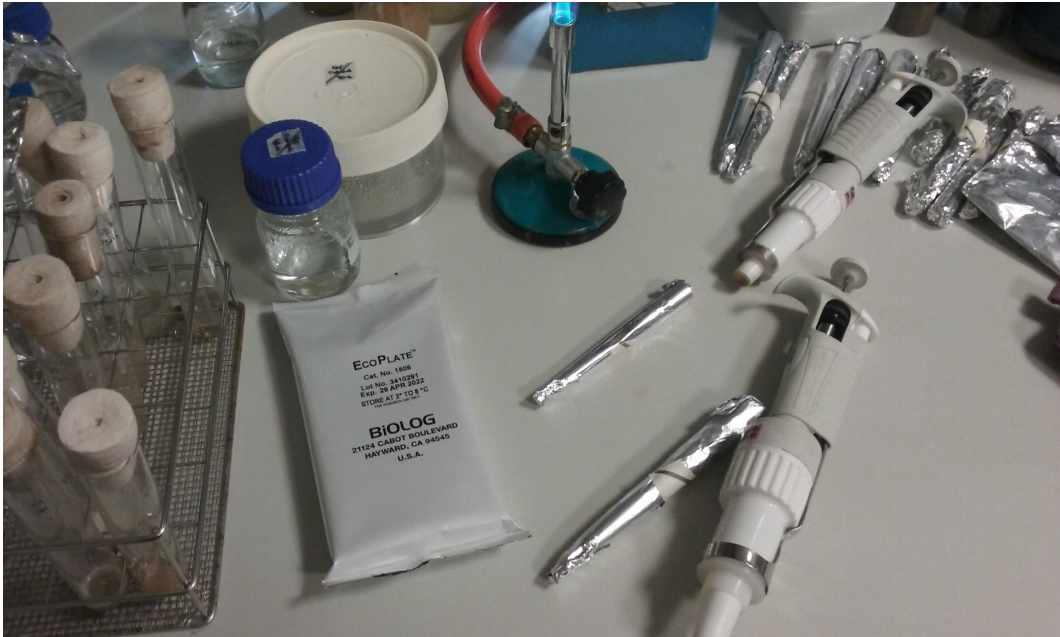


Figura 6. Material necesario para preparar las *Biolog EcoPlates*TM. Fuente: Elaboración propia.

Tras el período de incubación se midió la intensidad del color azul producido como consecuencia de la metabolización de las fuente carbonadas mediante el análisis de la absorbancia (Densidad Óptica, OD) a 590 nm empleando un espectrofotómetro para microplacas EON Biotek (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EEUU) (Garland, 1997). A partir de esta medida se determinaron los parámetros que se describen a continuación (Feigl *et al.*, 2017):

- Riqueza del sustrato (SR). Es el número de sustratos oxidados, y se calculó a partir de la suma del número de celdas, donde el valor de OD fue superior a 0,15, de la siguiente forma: $SR = \sum OD_i \geq 0,15$ (Garau *et al.*, 2007). Es un indicador sencillo y neto de la riqueza funcional.
- Valor medio de intensidad de color en cada pocillo (AWCD, del inglés *Average Well Color Development*). Es un indicador de la intensidad de la actividad metabólica de la comunidad microbiana. Se obtuvo a partir de todas las fuentes de carbono, de acuerdo a la siguiente ecuación: $AWCD = \sum OD_i / N$, donde OD_i es el valor corregido de OD (resta de los valores de control, correspondientes al pocillo en blanco, de cada pocillo de la placa), y N es el número de sustratos, en este caso 31 (Gryta *et al.*, 2014).
- Valor medio de intensidad de color en cada pocillo por tipo de sustrato (SAWCD, del inglés *Substrate Average Well Color Development*). Agrupa los valores de AWCD por tipo de sustrato. Se entiende como el desarrollo de color del pocillo promedio de sustrato basado en distintas fuentes de carbono que presentan naturaleza química similar (ácidos carboxílicos, carbohidratos, aminoácidos, aminas, polímeros y fenólicos), determinando el potencial de las comunidades microbianas que metabolizan los sustratos mencionados (Contreras, 2020). Se calculó con la siguiente ecuación: $SAWCD = \sum OD_i / N$ (Kenarova *et al.*, 2014), con 'i' considerando en cada caso sólo los sustratos de los 6 grupos químicos anteriores.
- Diversidad de Shannon (H). Utilizado en este caso para la diversidad fisiológica de la comunidad bacteriana. Es un indicador de biodiversidad y de reparto del uso de los

recursos entre los diferentes grupos funcionales. Se obtuvo a partir del cálculo: $H = -\sum P_i \times (\ln P_i)$ donde P_i es igual a la división entre OD_i y la sumatoria de OD_i : $P_i = OD_i / \sum OD_i$ (Feigl *et al.*, 2017).

- Equidad de Shannon (E). Mide la equitabilidad de actividades en todos los sustratos utilizados (Zak *et al.*, 1994), es decir, cómo de balanceadas se encuentran las actividades metabólicas. Se obtiene a partir de la división entre el índice de diversidad de Shannon y la riqueza de sustratos (SR), de acuerdo con la siguiente fórmula: $E = H / \ln SR$ (Gryta *et al.*, 2014).

3.4. Análisis Estadístico

Todas las mediciones se realizaron por triplicado y los datos se presentaron como la media y desviación estándar. Para todos los análisis estadísticos se empleó un nivel de significación de $p < 0,05$. Con el objetivo de comprobar si los datos siguen una distribución normal, se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, que es muy similar a la de Shapiro-Wilk, pero más adecuada para más de 50 muestras. Una vez determinada la normalidad de las variables, la comparación de valores para los niveles de punto de muestreo, profundidad, tipo de material y zona (no saturada vs saturada) se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba post hoc de comparación múltiple de Fisher de mínima diferencia significativa (LSD). Para establecer las relaciones existentes entre las distintas variables utilizadas en este estudio, se llevó a cabo un análisis de correlación de Spearman. Los programas empleados en el análisis estadístico de los datos obtenidos fueron Excel 1.10 para la estadística descriptiva así como la realización de gráficas, y Statgraphics 18 para la estadística inferencial.

Al no existir datos para todas las profundidades evaluadas en todos los puntos de muestreo, no se pudo hacer un análisis con todos ellos y todas las profundidades (ANOVA Multifactorial), de manera que hubo que hacerlo individualmente para cada punto de muestreo. De tal forma, los datos se analizaron de acuerdo con los siguientes planteamientos: (1) sin considerar la profundidad, ¿hay diferencias entre los distintos puntos de muestreo?, (2) sin considerar puntos de muestreo, ¿hay diferencias entre profundidades y en qué profundidad se encuentran esas diferencias?, (3) para cada uno de los puntos de muestreo, ¿existen diferencias entre profundidades?, (4) ¿hay diferencias entre la zona no saturada y saturada?, y (5) ¿hay diferencias entre los diferentes sustratos?

4. Resultados

La biodiversidad funcional está relacionada con la diversidad de actividades metabólicas que la comunidad microbiana de las muestras analizadas puede desarrollar. Dichas actividades se analizaron en este trabajo mediante la técnica *Biolog EcoplateTM*, que permite sondear la capacidad de las comunidades microbianas con el objetivo de metabolizar 31 fuentes carbonadas diferentes. Los resultados de esta analítica hacen que se puedan determinar parámetros como: la riqueza de sustratos susceptibles de ser metabolizados (SR), la intensidad de la actividad metabólica global (AWCD) o agrupada por grupos de sustratos (SAWCD), el índice de biodiversidad de Shannon (H), que en este caso informa sobre la biodiversidad funcional, y el índice de equidad de Shannon (E).

En los siguientes apartados se describen los resultados obtenidos en este estudio. En primer lugar, se detallaron los patrones en los que se distribuyó la materia orgánica; a continuación, se explicó la diversidad y actividad funcional microbiológica a escala global, es decir, en todos los casos se incluyeron datos por muestra, profundidad, zona y material. Posteriormente

se describieron los patrones de distribución de todas las variables (SR, AWCD, H, E, MO y SAWCD) que presentó la microbiota a escala local, es decir, por cada punto de muestreo. Para terminar, se hizo un análisis de correlación de los distintos parámetros analizados. Es necesario mencionar que los datos numéricos se han incorporado en tablas en un Anexo final (Anexos I y II).

4.1. Patrones de Distribución de la Materia Orgánica

El porcentaje medio total de materia orgánica varió entre 1,31% (punto de muestreo 1) y 2,51% (punto de muestreo 8), hallándose diferencias estadísticamente significativas entre el punto de muestreo 8 y los puntos 1, 2, 4 y 9 (Figura 7, Tabla 3). El patrón general de acuerdo con la profundidad siguió una cierta tendencia en “V” (Figura 7), en la cual se produjo una disminución de materia orgánica en los 10 primeros metros, siendo el menor valor el de los 10 m (1,08%, Tabla 4), profundidad a partir de la cual se incrementó hasta alcanzar valores que superaron los de las zonas más superficiales; de hecho, a 35 m se encontró la zona de mayor contenido de materia orgánica, con un 4,03% (Tabla 4). No obstante, cabe destacar que existió bastante dispersión en los datos para este parámetro (Figura 7).

Por otra parte, se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido en materia orgánica de las zonas no saturada y saturada, siendo menor en la primera (1,42%) que en la segunda (2,01%, Figura 7). De igual forma, el tipo de material también registró diferentes valores para dicho parámetro: las arcillas, con 2,62%, registraron un contenido en materia orgánica significativamente superior al de arenas (1,25%) y roca (1,74%) (Figura 7).

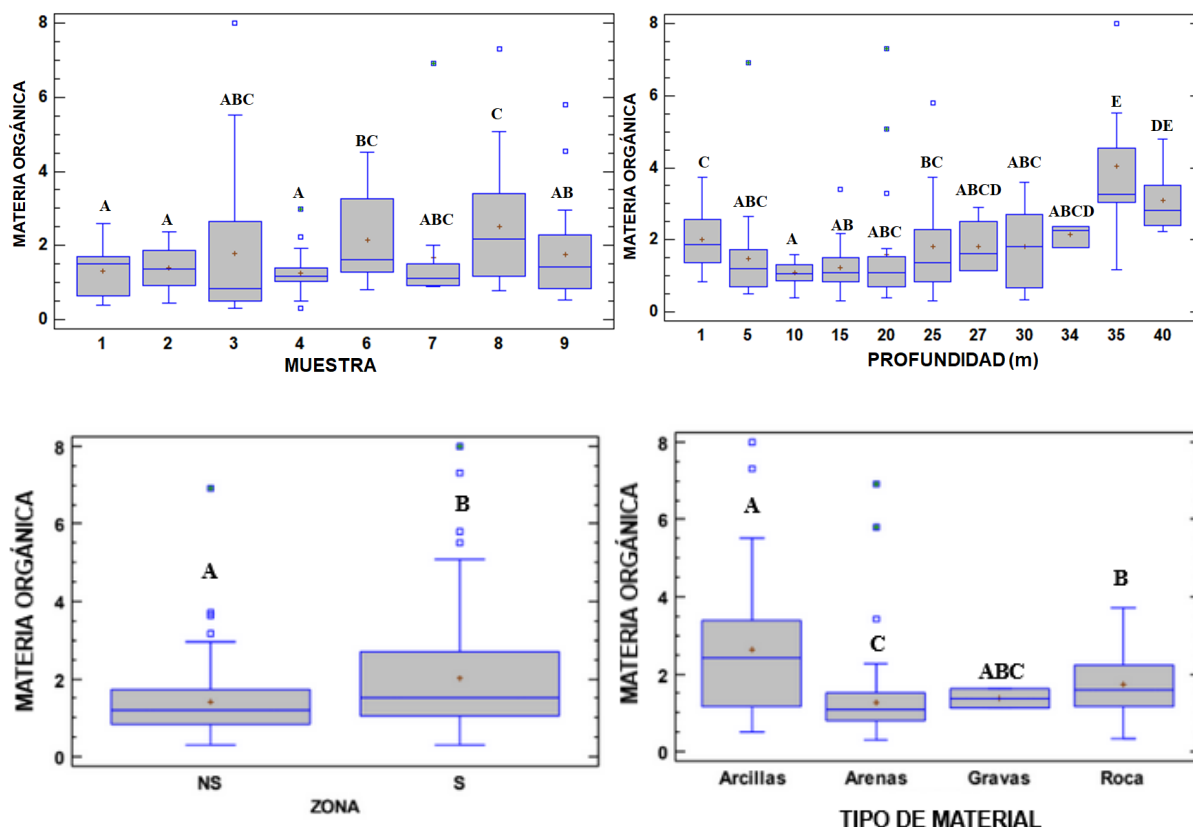


Figura 7. Diagrama de cajas del contenido en materia orgánica (%). Izquierda arriba, por puntos de muestreo; izquierda abajo, por zonas (NS, no saturada; S, saturada); derecha arriba por profundidades; derecha abajo, por tipo de material. Los asteriscos señalan el valor de la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

4.2. Diversidad y Actividad Funcional Microbiológica: Patrones Globales

4.2.1. Riqueza del Sustrato (SR)

El valor medio de SR varió entre 8,54 y 11,46 en las muestras 2 y 6, respectivamente. Las poblaciones microbianas de los puntos de muestreo 2, 8 y 9 utilizaron menos sustratos carbonados, con valores estadísticamente significativos y distintos a los del punto de muestreo 6, que es donde más sustratos utilizaron. En los puntos de muestreo 1, 3, 4 y 7 se obtuvieron valores intermedios, en torno a 10 sustratos (Figura 8, Tabla 5). La riqueza de sustratos por profundidad describió un patrón en “V” en el cual se produjo una disminución del número de sustratos carbonados utilizados por las poblaciones bacterianas hasta llegar a los 25 m con 7,86, donde volvió a incrementarse, alcanzando valores similares a los de las zonas más superficiales (Figura 8, Tabla 6).

El número de sustratos metabolizables por la comunidad microbiana fue significativamente superior en la zona no saturada que en la saturada, de 10,81 y 9,16, respectivamente (Figura 8). Por su parte, el tipo de material también influyó en este parámetro, de modo que, en roca alcanzó el mayor valor con 12,42, respecto a los obtenidos para arcillas, arenas y gravas, con 9,82, 9,07 y 7,33, respectivamente (Figura 8), sin diferencias significativas entre estos últimos.

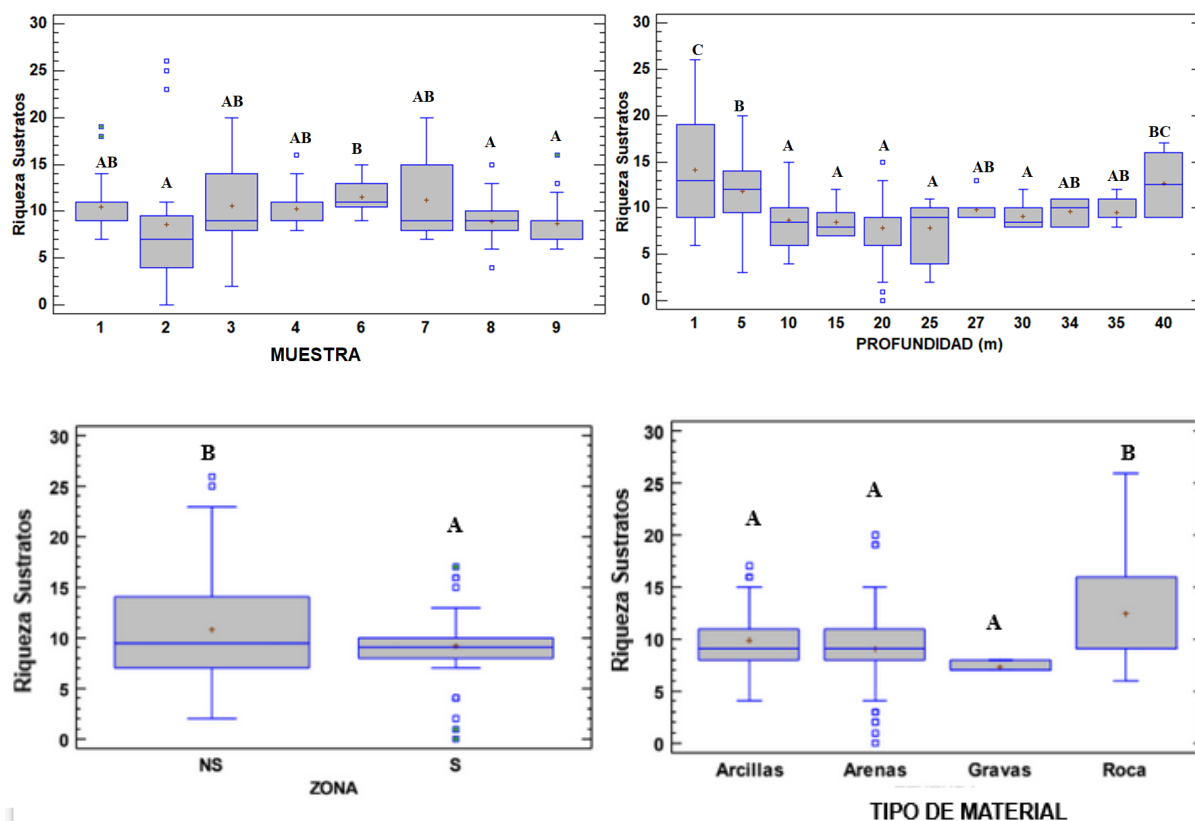


Figura 8. Diagrama de cajas de la riqueza de sustratos (SR). Izquierda arriba, por puntos de muestreo; izquierda abajo, por zonas (NS, no saturada; S, saturada); derecha arriba por profundidades; derecha abajo, por tipo de material del sustrato. Los asteriscos señalan el valor de la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

4.2.2. Intensidad de la Actividad Metabólica (AWCD)

La intensidad metabólica (AWCD) fue muy similar en todos los puntos de muestreo, variando entre 0,21 (punto de muestreo 9) y 0,34 (punto de muestreo 6). Sólo este último fue estadísticamente distinto del resto, menos del punto 7, con un valor de 0,28 (Figura 9, Tabla 7). Teniendo en cuenta la profundidad, se observó el mismo patrón en “V” que con las variables anteriores, es decir, una primera disminución de actividad metabólica hasta llegar a los 25 m, presentando valores inferiores a 0,2, a partir del cual volvió a incrementarse (Figura 9, Tabla 8).

Por su parte, se observaron ciertas diferencias entre la zona no saturada y la zona saturada en la intensidad metabólica, siendo en la primera más intensa que en la segunda, con 0,27 y 0,23, respectivamente (Figura 9); sin embargo, estas diferencias no fueron significativas. En la porosidad (Figura 9), las que más intensidad metabólica presentaron fueron roca y arcillas, con valores de 0,3, significativamente superiores a los obtenidos en arenas (0,21) o las gravas (0,18).

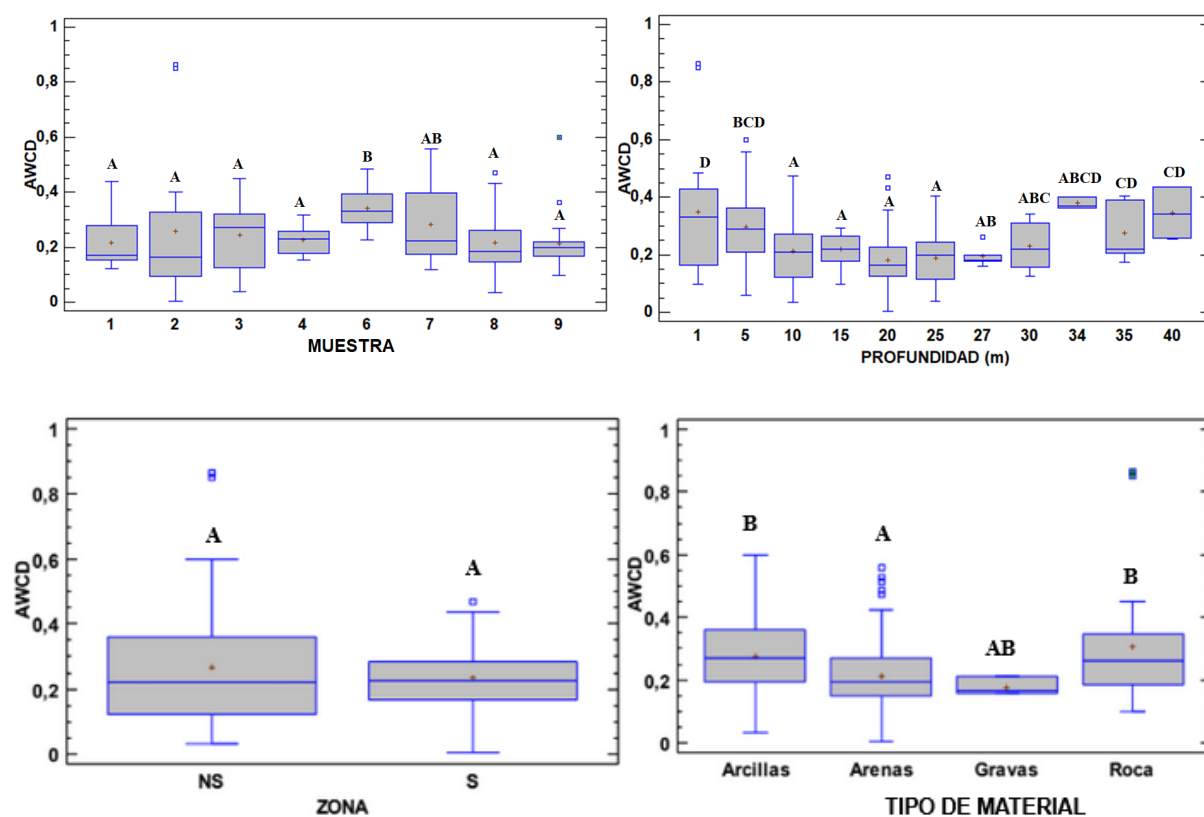


Figura 9. Diagrama de cajas de la intensidad metabólica (AWCD, del inglés *Average Well Color Development*). Izquierda arriba, por puntos de muestreo; izquierda abajo, por zonas (NS, no saturada; S, saturada); derecha arriba por profundidades; derecha abajo, por tipo de material del sustrato. Los asteriscos señalan el valor de la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

4.2.3. Biodiversidad Funcional: Índice de Shannon (H)

La biodiversidad funcional, calculada mediante el índice de Shannon (H), para las muestras de todos los puntos de muestreo alcanzó valores similares en los puntos 1, 3, 4, 7 y 8, que oscilaron entre 2,24 y 2,34 (Figura 10, Tabla 9). El punto de muestreo 2 fue el que mostró menor diversidad metabólica (2,10) y el 6 fue el más diverso (2,42), mostrando diferencias

estadísticamente significativas entre sí. En cuanto a la profundidad, se vuelve a observar el mismo patrón que en las variables anteriores: disminución de la biodiversidad hasta los 25 m, con 2,14, para incrementarse, alcanzando valores similares a los iniciales de 2,55 a los 40 m (Figura 10, Tabla 10).

En relación a las distintas zonas diferenciadas de la ZC, de nuevo la zona no saturada presentó una diversidad funcional significativamente superior a la saturada, con 2,34 y 2,23 respectivamente (Figura 10). El material roca tuvo los valores más altos de diversidad (2,43), estadísticamente distintos arenas y gravas, con valores similares entre sí: arcillas (2,29), arenas (2,22), y con gravas (2,01) (Figura 10).

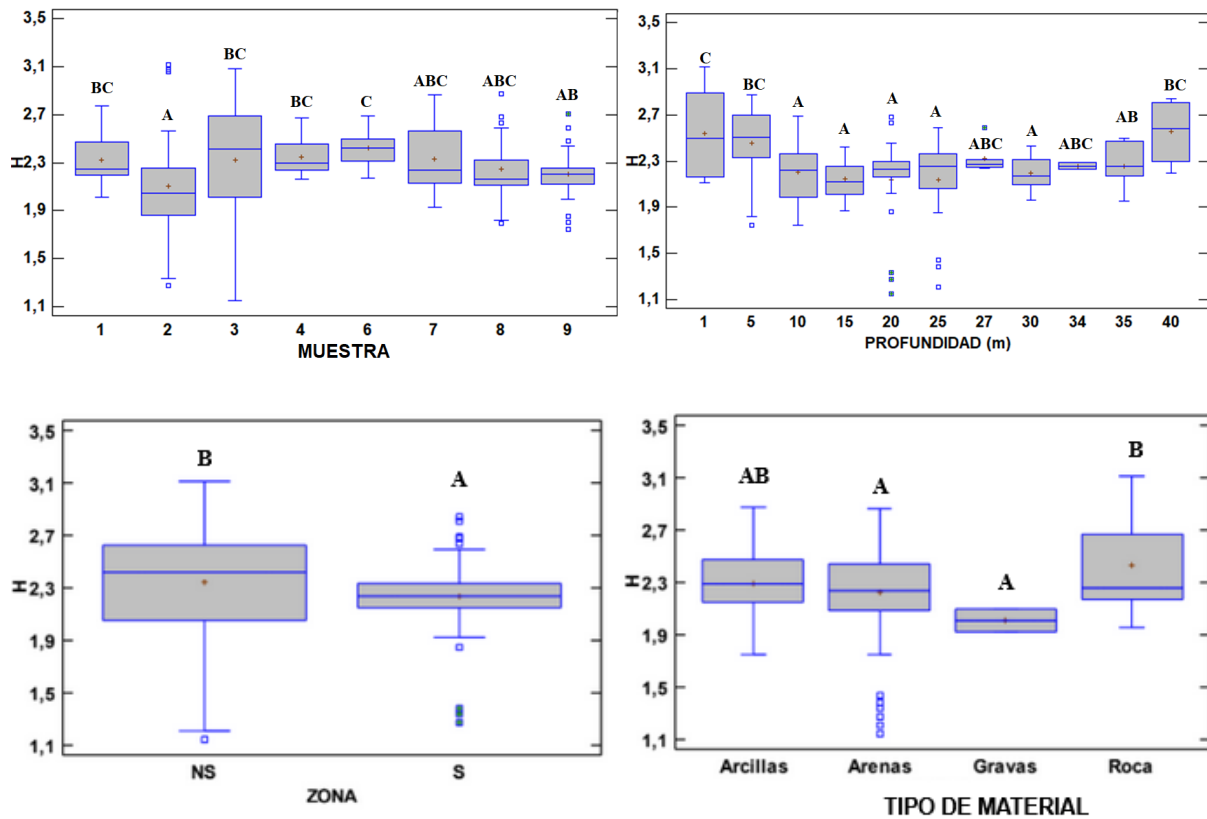


Figura 10. Diagrama de cajas de la diversidad funcional (H). Izquierda arriba, por puntos de muestreo; izquierda abajo, por zonas (NS, no saturada; S, saturada); derecha arriba por profundidades; derecha abajo, por tipo de material del sustrato. Los asteriscos señalan el valor de la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

4.2.4. Biodiversidad Funcional: Índice de Equidad de Shannon (E)

Ninguno de los factores evaluados influyó significativamente sobre los valores de la equidad (Figura 11). En general se alcanzaron valores de entre 0,99 y 1,08 en 20 m de profundidad y en la zona no saturada, respectivamente. El único aspecto destacable fue la mayor equidad obtenida a una profundidad de 25 m (1,17) respecto a otras profundidades (Tabla 12), y en el punto de muestreo 3, con 1,12 (Tabla 11) con respecto al resto de puntos de muestreo.

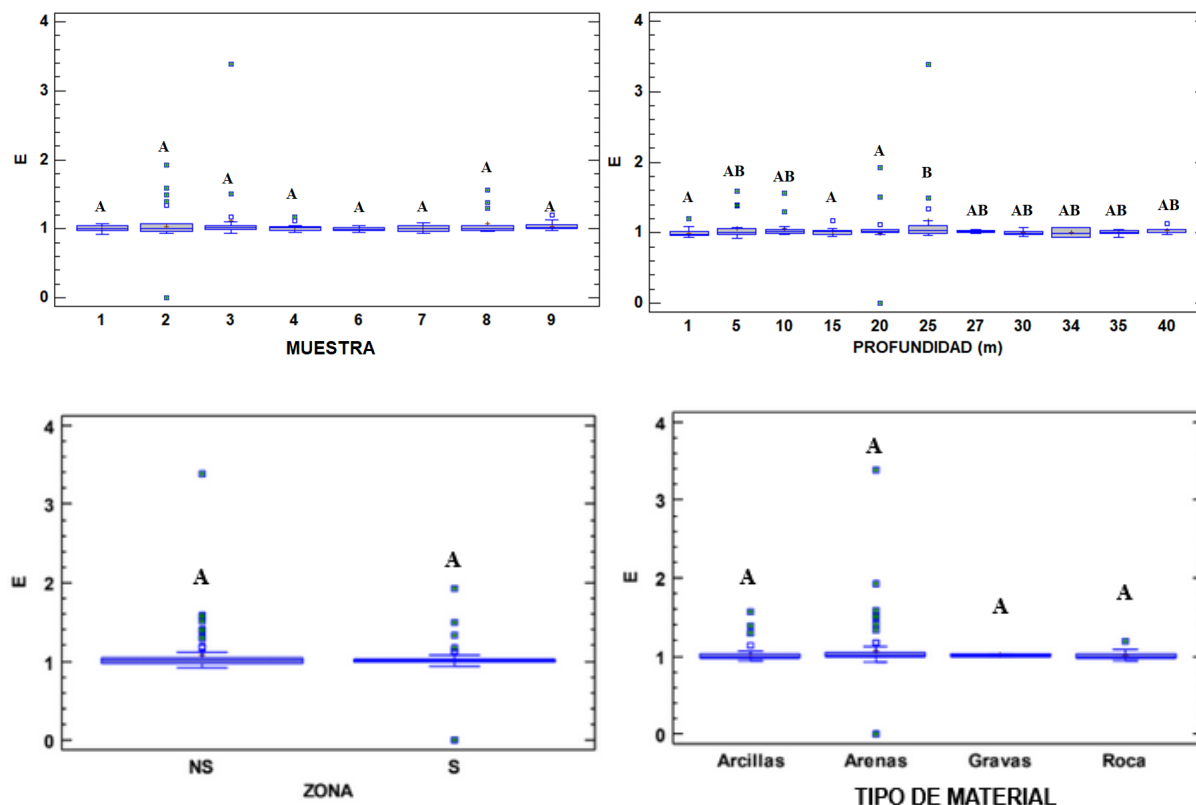


Figura 11. Diagrama de cajas del índice de Equidad (E). Izquierda arriba, por puntos de muestreo; izquierda abajo, por zonas (NS, no saturada; S, saturada); derecha arriba por profundidades; derecha abajo, por tipo de material del sustrato. Los asteriscos señalan el valor de la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

4.2.5. Intensidad de la Actividad Metabólica por la Naturaleza de las Fuentes de Carbono (SAWCD)

4.2.5.1. Ácidos Carboxílicos

La intensidad de la actividad metabólica de ácidos carboxílicos fue significativamente superior en el pozo 6 (0,58) que en el resto de puntos, cuyos valores variaron entre 0,31 y 0,40 (Figura 12, Tabla 13). En relación a la profundidad, el patrón que se siguió en esta variable fue una disminución de intensidad metabólica de los ácidos carboxílicos hasta llegar a los 20 m, con 0,29, a partir del cual se incrementó superando los valores de las zonas más superficiales, alcanzando valores de 0,70 a los 34 m (Figura 12, Tabla 14).

En la diferenciación entre zonas, en este caso fue en la zona saturada donde más ácidos carboxílicos se metabolizaron, con 0,40 (Figura 12) frente a 0,35 de la zona no saturada; aunque, no hubo diferencias significativas. En las arcillas, la metabolización de estos sustratos fue significativamente superior (0,45) al de arenas (0,33), material en el que se alcanzaron los niveles más bajos; mientras que rocas y grava presentaron valores intermedios y sin diferencias significativas: 0,40 y 0,29, respectivamente (Figura 12).

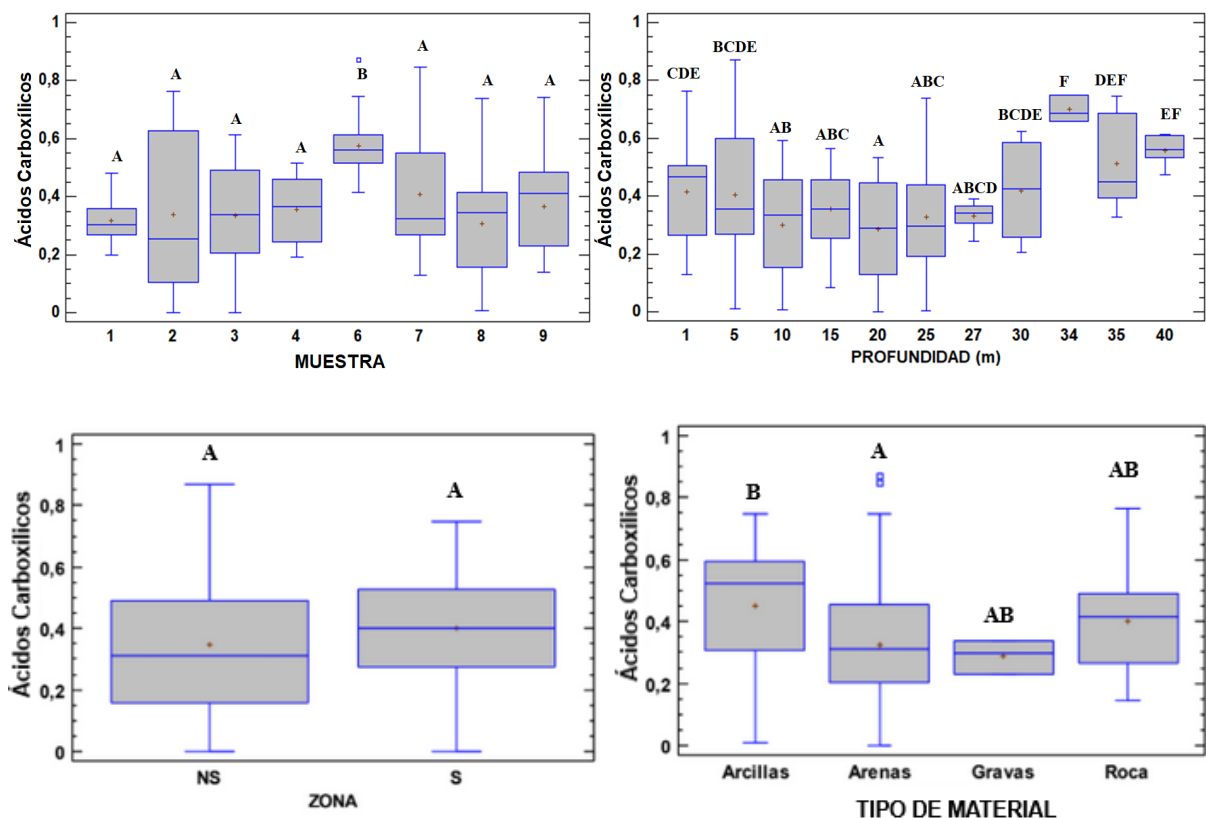


Figura 12. Diagrama de cajas de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono ácidos carboxílicos. Izquierda arriba, por puntos de muestreo; izquierda abajo, por zonas (NS, no saturada; S, saturada); derecha arriba por profundidades; derecha abajo, por tipo de material del sustrato. Los asteriscos señalan el valor de la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

4.2.5.2. Carbohidratos

La metabolización de carbohidratos (Figura 13), fue significativamente superior en los puntos de muestreo 2 y 6, con valores de 0,25 y 0,26, respectivamente, que en el resto de puntos de muestreo, siendo el punto 9 el menor con 0,11 (Figura 13, Tabla 15). Con la profundidad, se observó una disminución brusca de intensidad metabólica de carbohidratos en el primer metro, con un valor de 0,41, hasta llegar a los 25 m con un 0,10 (Tabla 16), a partir del cual se produjeron altibajos hasta llegar a los 40 m, destacándose que los valores de las profundidades 34 m (0,19) y 40 m (0,24) fueron estadísticamente semejantes a los de la profundidad de 1m (Figura 13).

En este caso, fue en la zona no saturada donde la intensidad metabólica de carbohidratos, (0,25) fue significativamente superior que en la saturada (0,13). Por otra parte, el material roca fue donde más se metabolizó este sustrato (0,29), siendo estadísticamente distinto a arcillas (0,19) y arenas (0,15) (Figura 13). Las gravas registraron un valor muy bajo (0,07), pero estadísticamente semejante al resto de los materiales.

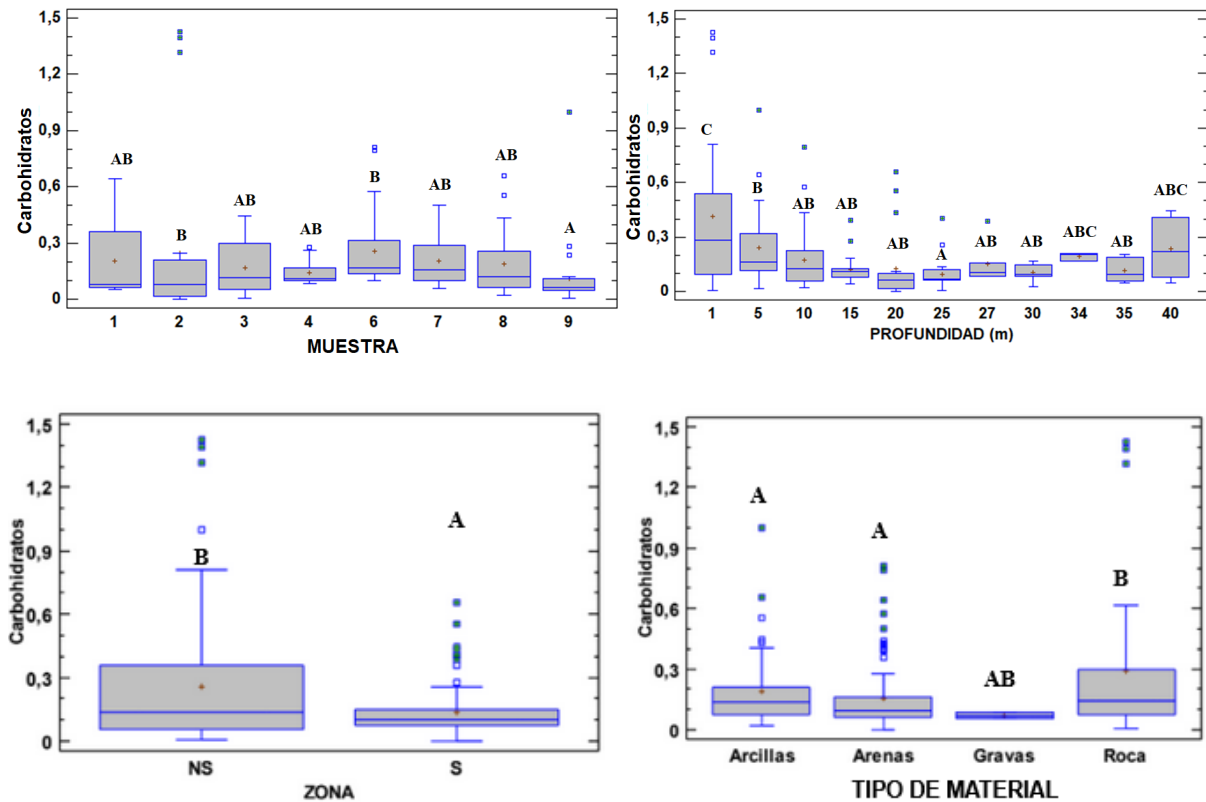


Figura 13. Diagrama de cajas de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono carbohidratos. Izquierda arriba, por puntos de muestreo; izquierda abajo, por zonas (NS, no saturada; S, saturada); derecha arriba por profundidades; derecha abajo, por tipo de material del sustrato. Los asteriscos señalan el valor de la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

4.2.5.3. Aminoácidos

El uso de aminoácidos por los microorganismos (Figura 14, Tabla 17) fue mayor en los puntos 3 y 7, con valores entre 0,22 y 0,24, que en el resto de puntos de muestreo, cuyos valores fueron más homogéneos, siendo los del punto 8 los menores, con 0,11 de intensidad. En cuanto a profundidad (Figura 14, Tabla 18), se tendió hacia una disminución brusca de intensidad metabólica a los 5 m hasta a los 27 m, pasando de 0,24 a 0,10, a partir del cual aumentaron hasta llegar a 0,21 en los 40 m.

En la zona no saturada se metabolizaron más aminoácidos que en la saturada (Figura 14): 0,19 y 0,14, respectivamente. En relación al material, en roca fue donde la metabolización fue mayor (0,22), con diferencias estadísticamente significativas con arcillas (0,16) y arenas (0,15). Gravas mostró datos bajos (0,09) pero estadísticamente semejantes a las tres anteriores (Figura 14).

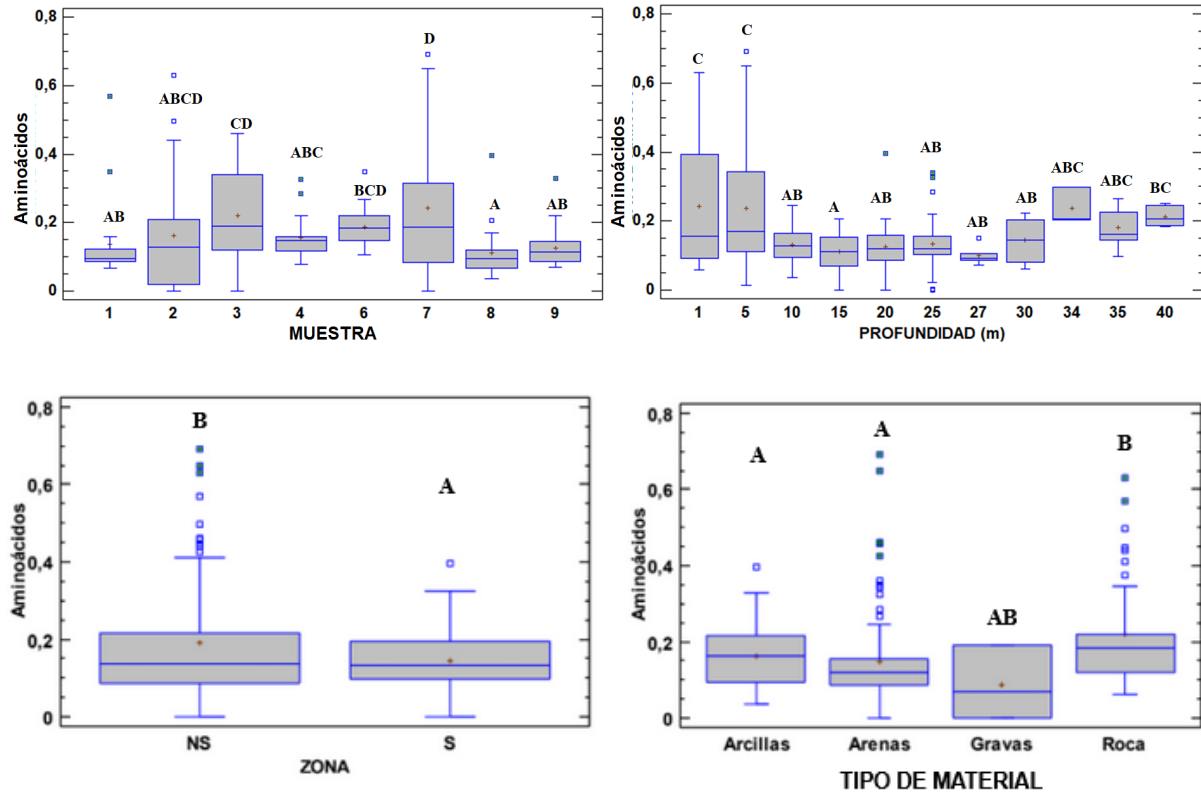


Figura 14. Diagrama de cajas de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono aminoácidos. Izquierda arriba, por puntos de muestreo; izquierda abajo, por zonas (NS, no saturada; S, saturada); derecha arriba por profundidades; derecha abajo, por tipo de material del sustrato. Los asteriscos señalan el valor de la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

4.2.5.4. Aminas

La intensidad metabólica de las aminas (Figura 15, Tabla 19) fue significativamente superior en el punto de muestreo 7 (0,14) que en el resto de puntos, salvo los 2 y 3, cuyos valores fueron los más bajos y homogéneos (0,02). En cuanto a la profundidad, se registró un incremento brusco de la intensidad metabólica en el metro 5, llegando a 0,16, para luego fluctuar con la profundidad con un descenso a los 15 m (0,01), donde se estabilizó hasta los 34 m, profundidad a la que se volvió a incrementar, reduciéndose nuevamente hasta los 40 m (Figura 15, Tabla 20).

En este caso, también fue en la zona no saturada donde más aminas se metabolizaron, con valores de 0,09, con respecto a la zona saturada (0,02) (Figura 15) y con diferencias estadísticamente significativas. Por su parte, no se hallaron diferencias significativas entre los materiales. La metabolización fue de 0,07 en rocas, 0,05 en arenas, 0,01 en gravas y 0,03 en arcillas.

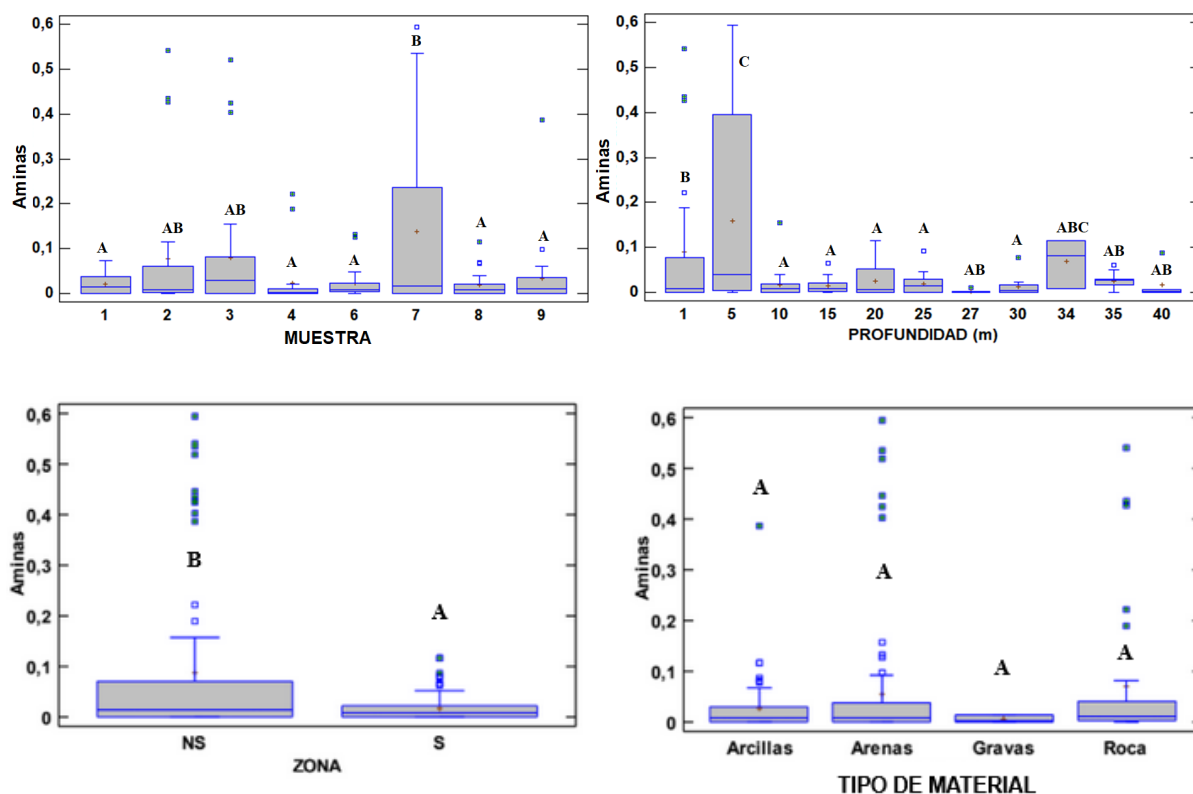


Figura 15. Diagrama de cajas de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono aminas. Izquierda arriba, por puntos de muestreo; izquierda abajo, por zonas (NS, no saturada; S, saturada); derecha arriba por profundidades; derecha abajo, por tipo de material del sustrato. Los asteriscos señalan el valor de la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

4.2.5.5. Polímeros

El punto de muestreo 6 destacó por la mayor intensidad de la actividad metabólica de polímeros, alcanzando un valor de 0,67, respecto al resto de puntos de muestreo, estadísticamente distinto a los demás. En el resto de puntos, excepto el 1 con 0,37, los valores fueron similares, oscilando entre 0,47 y 0,52 (Figura 16, Tabla 21). Según la profundidad (Figura 16, Tabla 22), el patrón observado fue de un mantenimiento de los valores en torno a 0,50 hasta los 15 m, donde se incrementó la intensidad metabólica, para luego volver a bajar a los 20 m a valores inferiores a los iniciales donde, más o menos, se mantuvo hasta los 27 m cuando subió bruscamente desde 0,39 hasta los 34 m con 0,83, para ya disminuir un poco pero aún así mantenerse.

En la zona saturada fue donde más se metabolizaron los polímeros, con 0,54 y 0,47 en la no saturada, existiendo diferencias significativas entre ambas (Figura 16). Por otra parte, el material arcillas fue el que mayor eficiencia tuvo en cuanto al metabolismo de polímeros (Figura 16), con 0,61, todo lo contrario de arenas (0,44); en situación intermedia se encontraron gravas (0,57) y roca (0,54); se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre arcillas y arenas y roca.

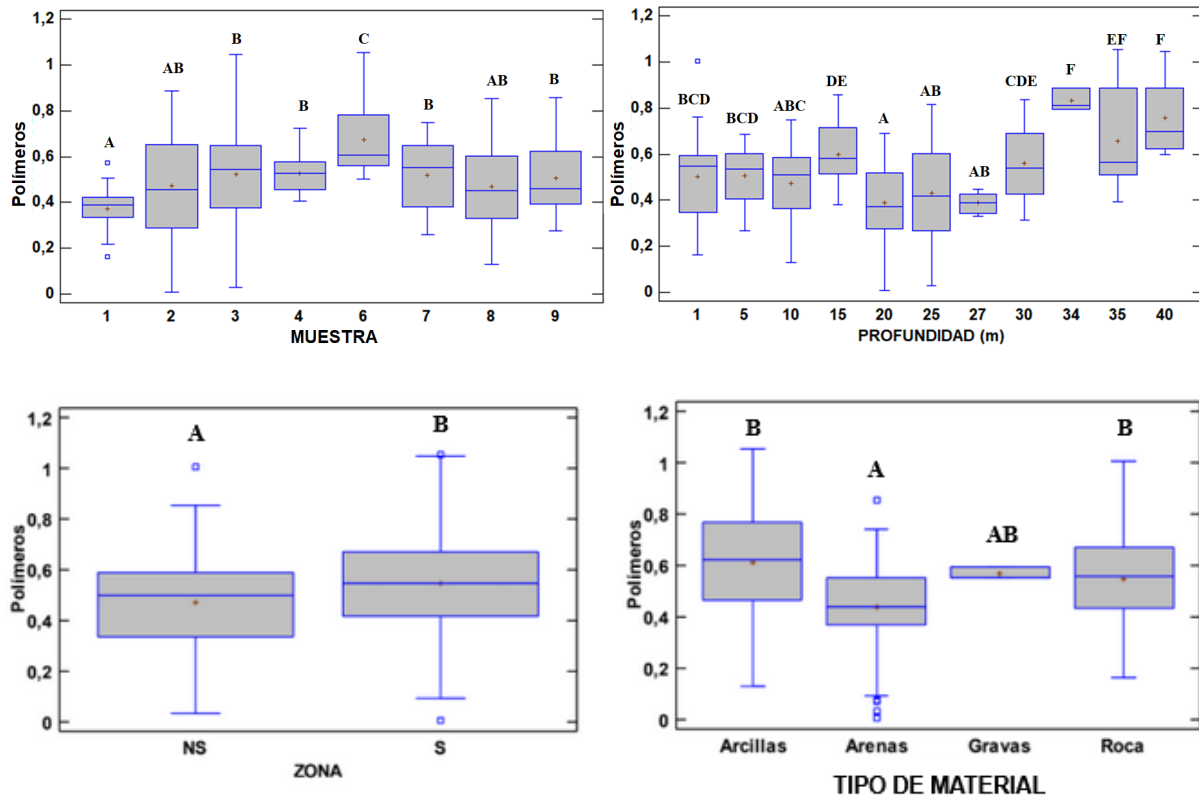


Figura 16. Diagrama de cajas de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono polímeros. Izquierda arriba, por puntos de muestreo; izquierda abajo, por zonas (NS, no saturada; S, saturada); derecha arriba por profundidades; derecha abajo, por tipo de material del sustrato. Los asteriscos señalan el valor de la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

4.2.5.6. Fenólicos

El punto de muestreo 7 fue donde más se metabolizaron los compuestos fenólicos, con un valor de 0,06; en 1, 2 y 6 los valores fueron homogéneos e intermedios, con 0,04; los puntos 3, 4, 8 y 9 presentaron los valores más bajos y semejantes entre sí, de 0,01 y 0,02 (Tabla 23). En cuanto a la profundidad, la tendencia que se siguió fue en “V”, con una bajada continua de intensidad metabólica hasta los 10 m desde 0,09 a 0 (Figura 17, Tabla 24), a partir del cual se produjeron ciertos altibajos hasta los 30 m, cuando se dio una subida hasta los 40 m, pero en ningún caso sin superar valores de 0,05.

En estos sustratos el metabolismo en la zona no saturada (0,05) fue mayor que el de la zona saturada (0,01), existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos (Figura 17). El material roca fue donde hubo una mayor metabolización de fenólicos, con 0,07, valor estadísticamente distinto al de arcillas y arenas; en el resto, los valores fueron muy similares: arcillas (0,02), arenas (0,02) y gravas (0) (Figura 17).

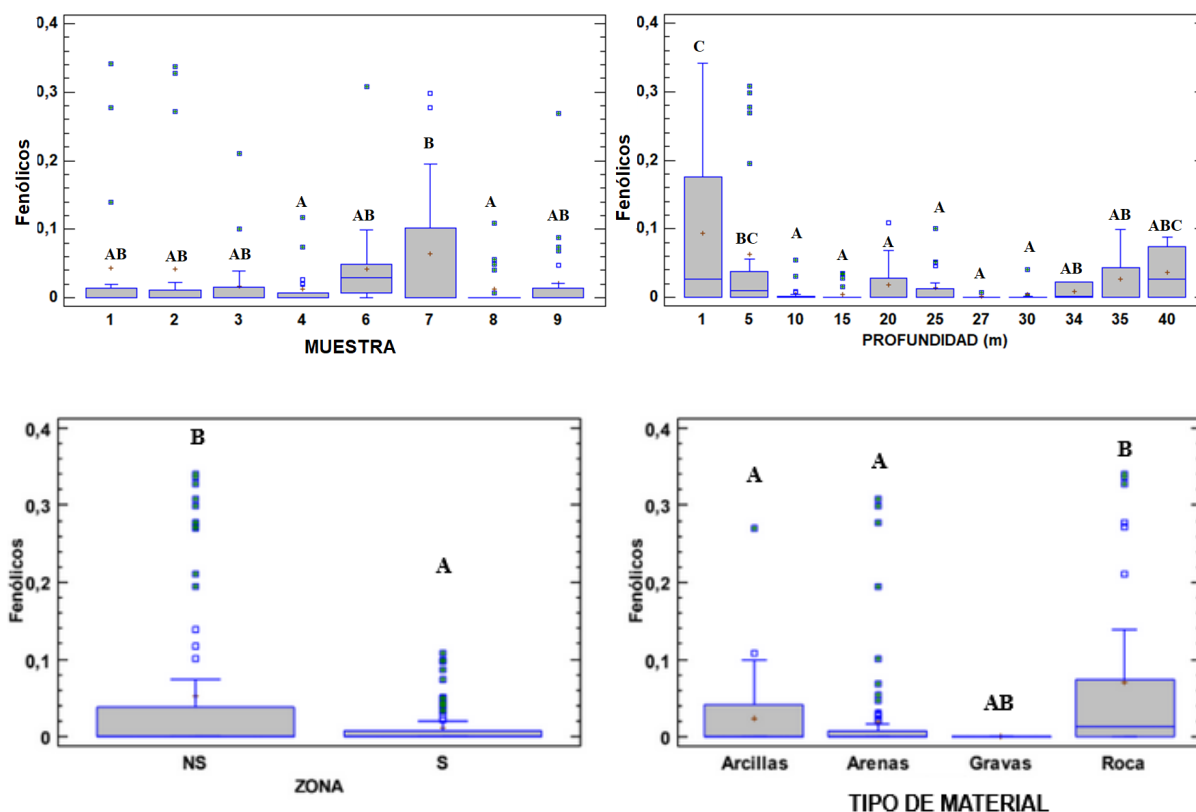


Figura 17. Diagrama de cajas de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono fenólicos. Izquierda arriba, por puntos de muestreo; izquierda abajo, por zonas (NS, no saturada; S, saturada); derecha arriba por profundidades; derecha abajo, por tipo de material del sustrato. Los asteriscos señalan el valor de la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

4.3. Diversidad y Actividad Funcional Microbiológica: patrones verticales por puntos de muestreo

4.3.1. Biodiversidad funcional

A continuación se describen para cada uno de los puntos de muestreo en el perfil vertical (profundidad), los resultados obtenidos para las variables relacionadas con la actividad microbiana y diversidad funcional (SR, AWCD, H, E), incluyendo también la materia orgánica (% MO) como parámetro pronosticado como influyente en los anteriores. En cada caso, se identifica la ubicación del nivel freático y de los materiales del perfil (véase Tablas 1 y 2).

En el punto de muestreo 1 (Figura 18) se produjo una disminución del número de sustratos utilizados (SR) con la profundidad hasta los 10 m, pero se recuperó algo, de manera muy suave, excepto en los primeros 5 m, observándose homogeneidad entre las profundidades de la zona saturada. La intensidad metabólica (AWCD) siguió un patrón de bajada continua desde 0,4 a 0,15 en los 10 m, a partir del cual se mantiene con cierta fluctuación, pero en general más o menos estable, manteniendo esos valores bajos hasta los 25 m; de forma general salvo a 1 y 5 m (zona no saturada), los valores fueron homogéneos. La biodiversidad funcional se mantuvo en valores superiores a 2, pero con una caída importante hasta los 10 m, de 2,65 a 2,10, volviendo a incrementarse de manera más suavizada hasta 2,25; salvo a 1 y 5 m de profundidad (zona no saturada), el resto fueron homogéneos (zona saturada). Con la equidad, se observó un incremento muy ligero con la profundidad, siendo el primer metro el

único diferente, 0,95 frente a 1 del resto de profundidades; por tanto, hubo homogeneidad a lo largo del perfil. Por último, el contenido de materia orgánica fue disminuyendo con la profundidad hasta los 20 m, pero experimentó un nuevo incremento en la profundidad cercana a la aparición del nivel de arcillas.

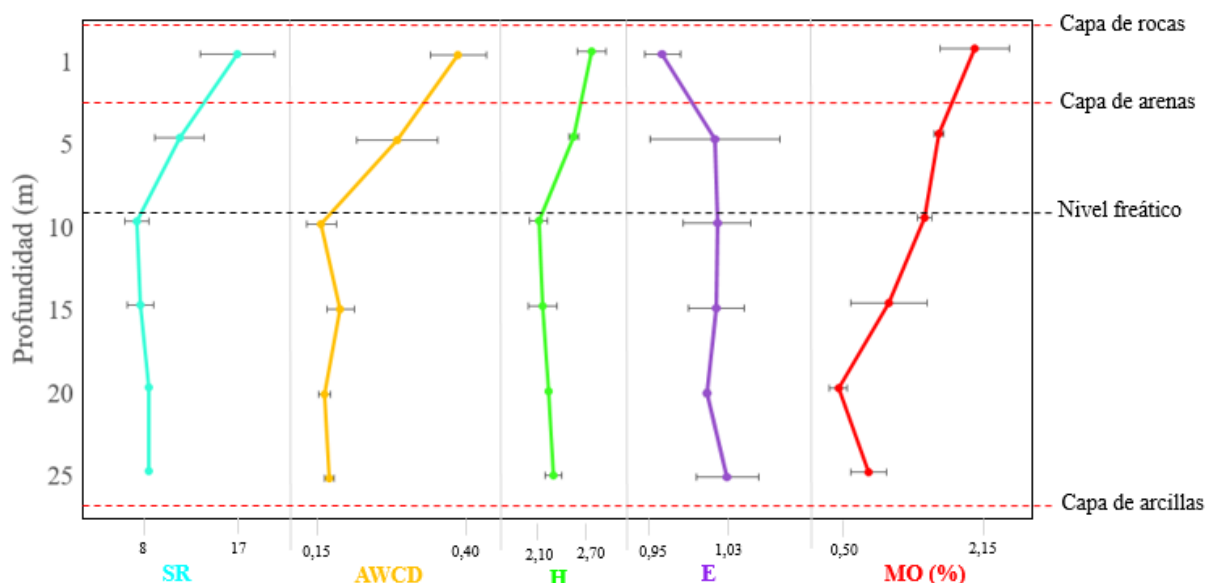


Figura 18. Distribución de la media de las variables estudiadas con la profundidad en el punto de muestreo 1. Se indican las barras de error estándar en cada dato, la profundidad de inicio de la capa de rocas, arenas y arcillas, y la del nivel freático (límite entre la zona no saturada y saturada).

El punto de muestreo 2 (Figura 19) registró un patrón en el uso de sustratos (SR) consistente en una disminución muy abrupta en el primer metro, desde 25 sustratos utilizados, para mantenerse en torno a los 7 hasta los 20 m (inicio de la zona saturada), a partir del cual volvió a incrementarse el número de sustratos, desde 1 hasta 9. La intensidad metabólica también experimentó un patrón semejante al anterior, bajando bruscamente en el primer metro de un valor de 0,85 a 0,15 en los 5 m; a los 10 m volvió a sufrir otra disminución, pero en este caso mucho más suave hasta alcanzar valores inferiores a 0,05 a los 20 m (inicio de la zona saturada), a partir del cual subió de manera considerable y constante hasta los 34 m, llegando a 0,38 de intensidad. El patrón del índice de Shannon fue muy similar a los descritos anteriormente: disminución importante hasta los 20 m (inicio de la zona saturada), alcanzando valores de 1,5, para volver a incrementarse, recuperando los valores de profundidades más superficiales, aunque en menor medida. En este caso se detectaron altibajos más claros en la equidad, siendo los 20 m (inicio de la zona saturada) el valor más bajo con 0,65, frente al más elevado a los 5 m con 1,35, pero en la mayoría de profundidades los valores se mantuvieron constantes. Finalmente, el contenido de materia orgánica sufrió variaciones, si bien es cierto que de forma general se incrementó con la profundidad: se produjo una disminución a los 20 m (inicio de la zona saturada), aumentando progresivamente en el límite entre la capa de arenas y arcillas.

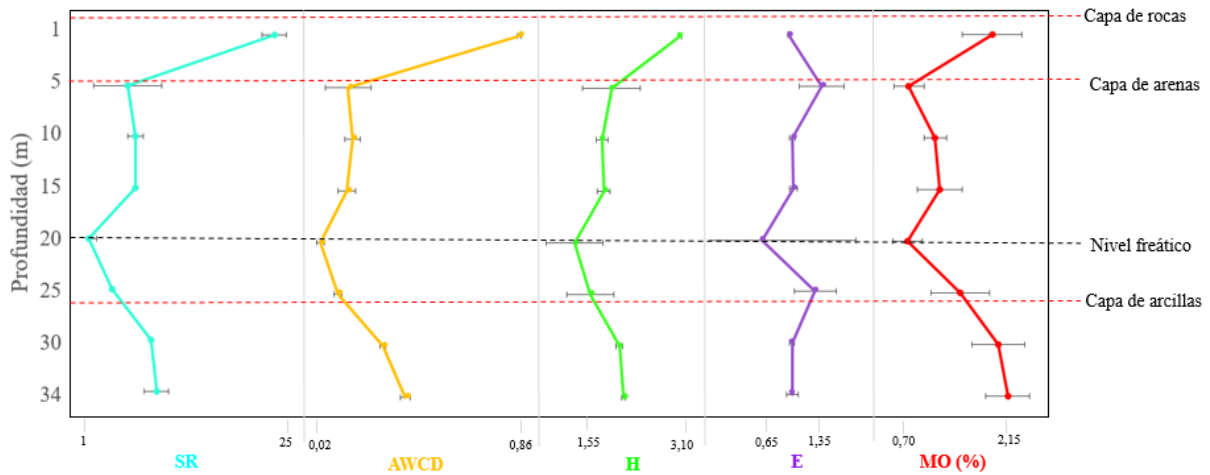


Figura 19. Distribución de la media de las variables estudiadas con la profundidad en el punto de muestreo 2. Se indican las barras de error estándar en cada dato, la profundidad de inicio de la capa de rocas, arenas y arcillas, y la del nivel freático (límite entre la zona no saturada y saturada).

En el punto de muestreo 3 (Figura 20) se observó un patrón semejante al anterior: disminución de manera constante del uso de sustratos hasta los 25 m (inicio de la zona saturada), reduciendo hasta 16 los sustratos utilizados, a partir del cual volvió a incrementarse, llegando a alcanzar valores similares a los de zonas superficiales. La intensidad metabólica siguió esta tendencia en “V”, observada en casos anteriores, es decir, disminuyó hasta los 25 m en más de 0,30 de intensidad, siendo más abrupta en los metros 1 y 15, y volvió a subir hasta recuperar los valores de 0,40 que se obtuvieron en el primer metro. La diversidad (H) mostró un patrón similar: disminución importante hasta los 25 m, también casi a la mitad, de 3 a 1,6, para volver a incrementarse, recuperando los valores de profundidades más superficiales, de 2,7. Los valores de equidad (E) fueron constantes hasta los 15 m con valores que rondan el 1, a partir del cual se incrementó ligeramente hasta los 25 m, siendo este el máximo, para luego volver a bajar y mantenerse en los valores de zonas más superficiales; excepto en ese punto, hubo una alta homogeneidad en todo el perfil. El porcentaje de materia orgánica experimentó una caída entre el primer metro y los 5 m, más hacia abajo se mantuvo con valores constantes, para subir a los 35 m, siendo aquí el máximo contenido en materia orgánica, donde ya hacen presencia las arcillas, alcanzando valores superiores a los más superficiales, con una disminución en la máxima profundidad analizada.

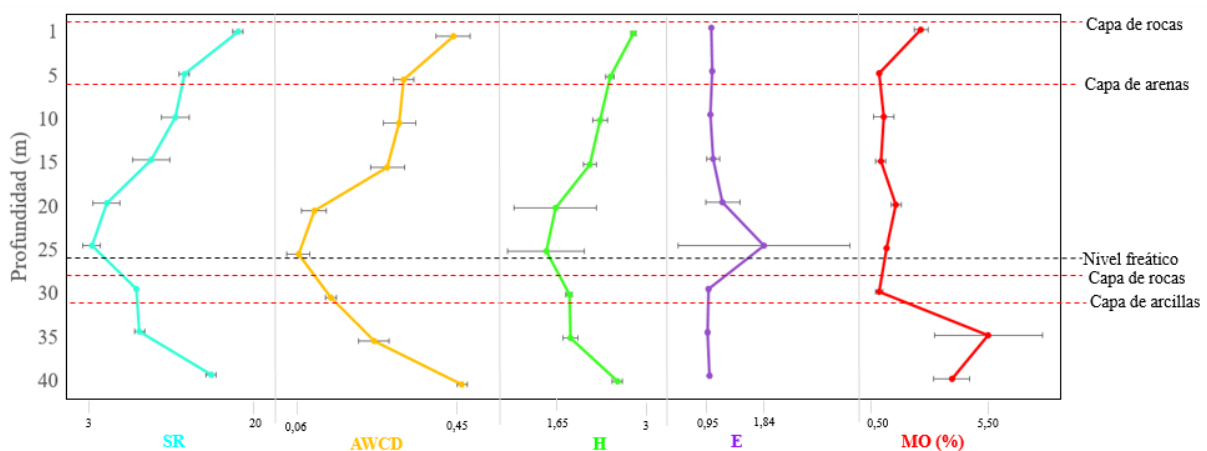


Figura 20. Distribución de la media de las variables estudiadas con la profundidad en el punto de muestreo 3. Se indican las barras de error estándar en cada dato, la profundidad de inicio de la capa de arenas, rocas y arcillas, y la del nivel freático (límite entre la zona no saturada y saturada).

En el punto de muestreo 4 (Figura 21) se identificaron dos máximos en la riqueza de sustratos (SR): a 1 y 15 m, con 14 y 11 sustratos utilizados, respectivamente, y de forma general, salvo esos dos valores, se mantuvo el número de sustratos rondando los 9; existió cierta homogeneidad a lo largo del perfil, excepto en el primer metro, correspondiente al valor más elevado. El patrón de la intensidad de la actividad metabólica (AWCD) con la profundidad fue muy semejante al de la variable anterior, con una bajada en el primer metro, desde 0,30 hasta 0,25, pero volvió a recuperarse hasta los 15 m, para volver a bajar abruptamente a los 20 con 0,15 de intensidad metabólica, y otra subida hasta los 27. Por la parte de la diversidad funcional (H), al igual que en el punto 1 como se vio anteriormente, se mantuvieron los valores por encima de 2, y se dieron dos picos: en el primer metro de 2,60 y en el 25 de 2,50; la bajada en ambos casos fue brusca y alcanzó valores similares de 2,25; en general, el patrón fue semejante al de las variables anteriores. La equidad (E) se incrementó de manera muy suave hasta los 10 m para caer a los 15 y subir de forma brusca hasta los 25 m, desde 0,95 a 1,10, para volver a caer. Por último, la materia orgánica disminuyó con la profundidad, salvo en el primer metro (todo el perfil fue en arenas), hasta los 25 m, a partir del cual comenzó a incrementarse.

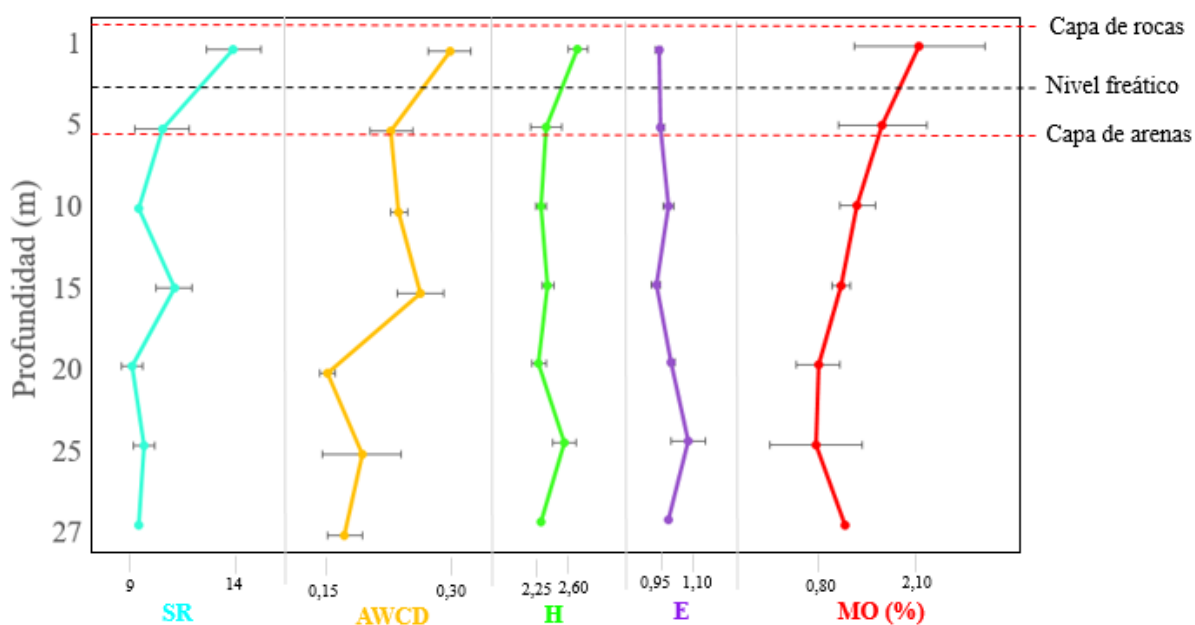


Figura 21. Distribución de la media de las variables estudiadas con la profundidad en el punto de muestreo 4. Se indican las barras de error estándar para cada dato, la profundidad de inicio de la capa de rocas y arenas, y la del nivel freático (límite entre la zona no saturada y saturada).

En el punto de muestreo 6 (Figura 22) se incrementó el número de sustratos utilizados con la profundidad en el primer metro y a partir de los 20 m, la bajada se dio a los 10 m, desde 14 sustratos utilizados hasta 9; se identificó cierta heterogeneidad a lo largo del pozo. La intensidad metabólica disminuyó en el primer metro, pero volvió a recuperarse de forma inmediata, para volver a bajar abruptamente hasta los 20 m, con una disminución total del orden de 0,15, pero se produjo otra subida hasta los 35, recuperando valores iniciales. En este punto los valores de diversidad funcional también estuvieron por encima de 2, aquí el pico máximo ocurrió a los 10 m de profundidad, con 2,65, se produjo una bajada importante hasta 2,25 y volvieron a incrementarse los valores con el aumento de la profundidad, llegando a 2,50 en los 5 primeros metros; se detectó heterogeneidad entre profundidades, especialmente con el metro 10. En cuanto a equidad, no hubo mucha variabilidad, siendo el pico más alto el de los 20 m con 1, y el más bajo a los 5 con 0,97, pero en las últimas profundidades se

produjo un incremento del índice. En este caso, también la materia orgánica sufrió una bajada durante los 10 primeros metros, con la presencia de arenas, para subir algo hasta los 15, pero volvió a bajar; sin embargo, ya con arcillas se dio un incremento brusco a los 25 m, a partir del cual ya aumentó, pero muy suavemente.

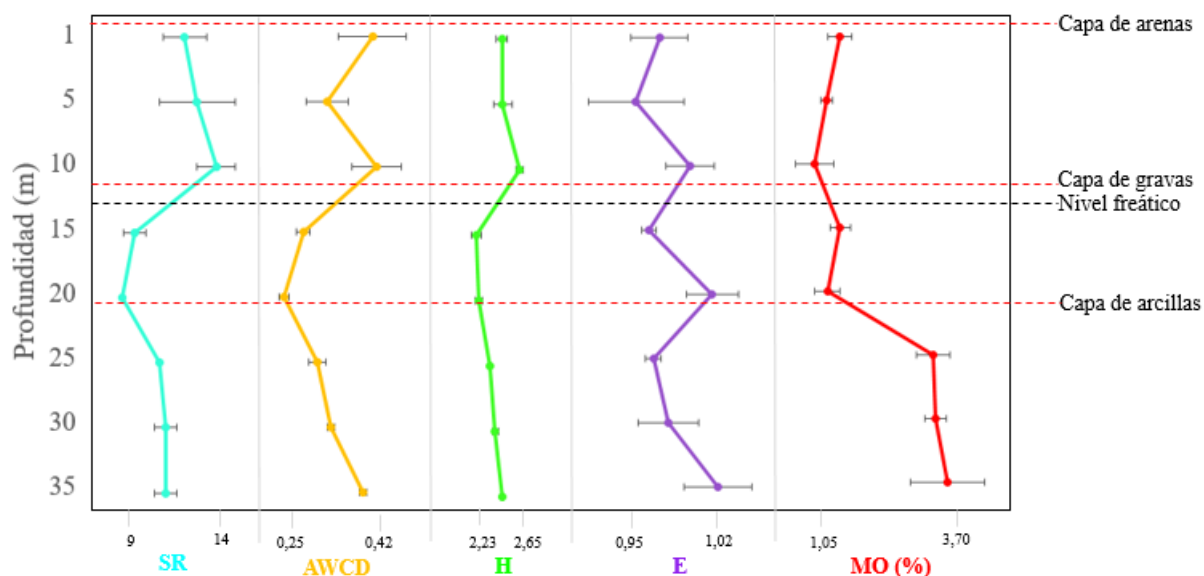


Figura 22. Distribución de la media de las variables estudiadas con la profundidad en el punto de muestreo 6. Se indican las barras de error estándar en cada dato, la profundidad de inicio de la capa de arenas, rocas y arcillas, y la del nivel freático (límite entre la zona no saturada y saturada).

En el punto de muestreo 7 (Figura 23) el uso de sustratos (SR) alcanzó un pico a los 5 m de profundidad, con 19 sustratos utilizados por los microorganismos, a partir del cual se dio una importante bajada hasta los 7. En el caso de la intensidad metabólica (AWCD), se produjo también una importante subida a los 5 m de profundidad, de 0,15 a 0,50, volviendo a bajar hasta los 15 m, alcanzando los valores de la zona más superficial. Con la diversidad funcional (H) ocurrió exactamente lo mismo que con el uso de sustratos y la intensidad metabólica: el máximo estuvo a los 5 m de profundidad con 2,85, a partir del cual se dio una importante bajada hasta 2. El valor máximo de equidad (E) se encontró a los 10 m con 1,05, pero volvió a disminuir a 1, sin embargo, este último valor fue superior a los primeros metros; en este caso hubo una alta homogeneidad a lo largo del perfil. Finalmente, con el porcentaje de materia orgánica hubo un pico de máximo contenido a los 5 m, incrementándose ligeramente a los 15 m, ya con las arcillas.

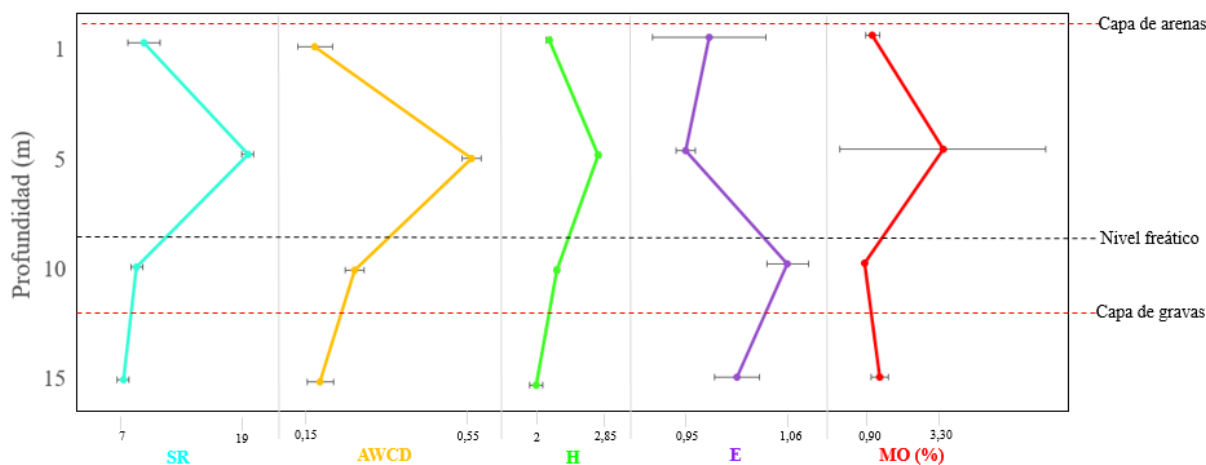


Figura 23. Distribución de la media de las variables estudiadas con la profundidad en el punto de muestreo 7. Se indican las barras de error estándar en cada dato, la profundidad de inicio de la capa de arenas y gravas, y la del nivel freático (límite entre la zona no saturada y saturada).

En el punto de muestreo 8 (Figura 24) se registró una bajada en el número de sustratos (SR) hasta los 10 m, de 9 a 5 sustratos, a partir del cual se incrementó superando los valores de zonas superficiales, observándose otra bajada a los 25 m, en este caso más leve, desde 13 sustratos hasta 10. La intensidad metabólica (AWCD) también disminuyó hasta los 10 m del orden de 0,10 para luego subir hasta los 20 m llegando a valores de 0,40, pero volvió a disminuir, en este caso a la mitad. Por otra parte, en el índice de Shannon (H) los valores se mantuvieron homogéneos, excepto un aumento hasta 2,60 a los 20 m, a partir del cual se produjo una disminución para luego volver a subir ligeramente a los 27 m; las profundidades presentaron homogeneidad, salvo en el pico que se da a los 20 m. Se identificó un máximo en la equidad (E) en los 10 m con un valor de 1,40, a partir del cual bajó hasta los 25 m rondando el valor de 1. El contenido en materia orgánica bajó desde el primer metro a la profundidad de 5 m, con valores constantes hasta los 15, con una subida cuando apareció la capa de arcillas; sin embargo, volvió a caer a los 25 m.

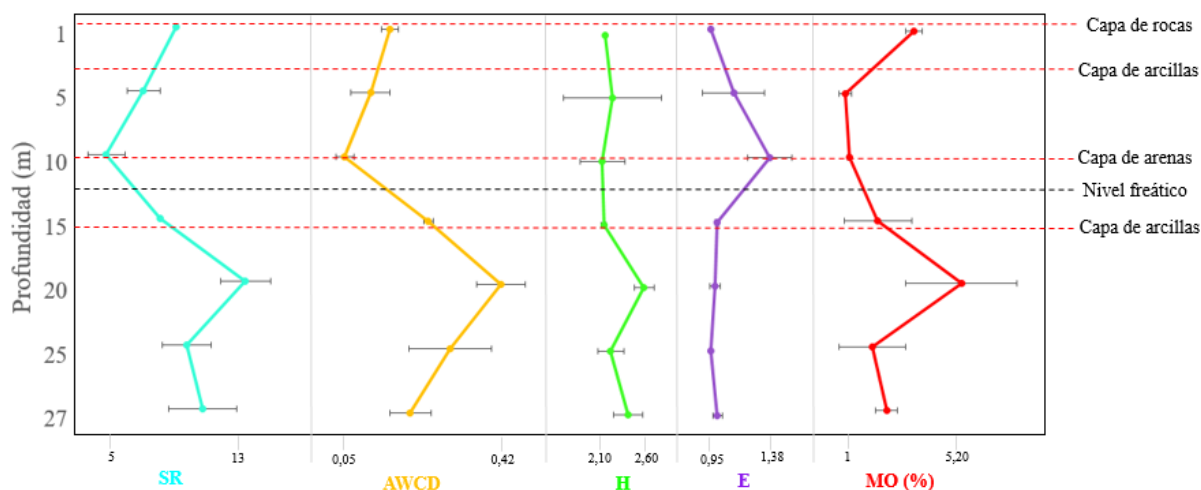


Figura 24. Distribución de la media de las variables estudiadas con la profundidad en el punto de muestreo 8. Se indican las barras de error estándar en cada dato, la profundidad de inicio de la capa de rocas, arenas y arcillas, y la del nivel freático (límite entre la zona no saturada y saturada).

Finalmente, en el punto de muestreo 9 (Figura 25) apareció un máximo a los 5 m con 14 sustratos, valor a partir del cual cayó bruscamente hasta los 6, para recuperarse de manera inmediata a los 10 m, a partir de ahí se incrementó y mantuvo hasta los 40 m, rondando los 9 sustratos. Se dio también un punto de máxima intensidad metabólica a los 5 m (0,45), pero se redujo de forma abrupta hasta los 10 m, con un valor de 0,15, se recuperó y se mantuvo más o menos estable rondando 0,20 de intensidad hasta alcanzar los 30 m, a partir del cual volvió a aumentar. En cuanto a diversidad funcional se dio el mismo patrón que con la mayoría de puntos de muestreo descritos anteriormente: se incrementaron los valores a partir del metro 10 de 1,80 a 2,30, si bien es cierto que disminuyó hasta ese punto, pero se recuperó; se identificó heterogeneidad entre profundidades, especialmente a los 5 y 10 m, correspondientes al pico máximo y mínimo respectivamente. Una bajada brusca en equidad ocurrió en el primer metro desde 1,12 para volver a incrementarse a los 5 m, y así hasta los 40 m, siempre rondando el valor de 1, con algunos altibajos pero al final aumentó, superando 1,05. Por último, en la materia orgánica se mantuvieron los valores hasta los 15 m, con la roca y arcillas, pero cuando aparecieron las arenas se incrementó, alcanzando el pico a los 25 m,

sufriendo posteriormente una bajada, por la presencia de agua (nivel freático), pero remontó a los 30 con las arcillas.

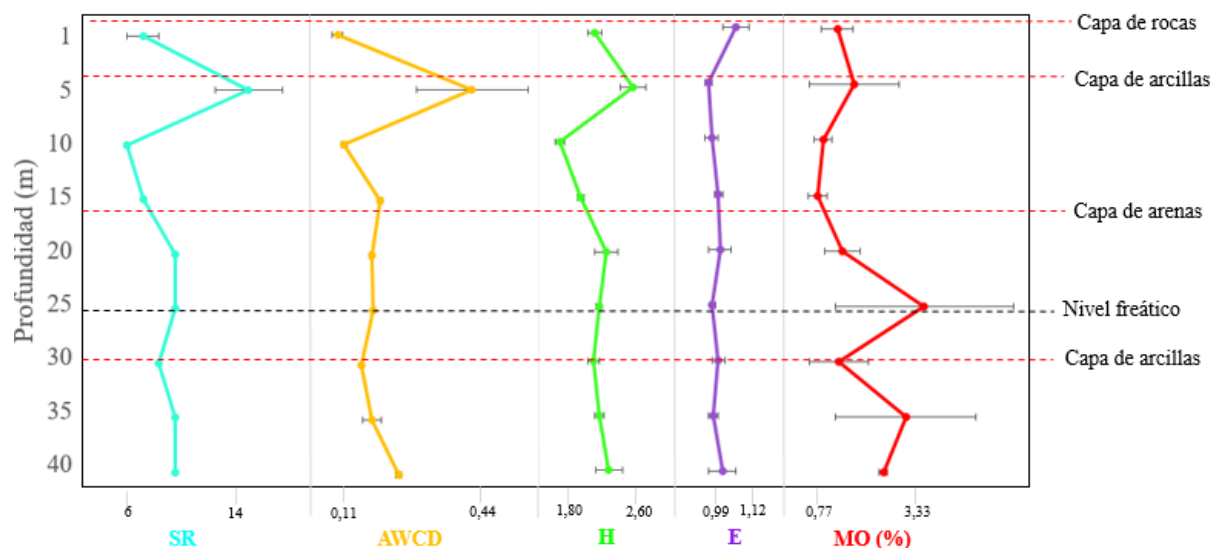


Figura 25. Distribución de la media de las variables estudiadas con la profundidad en el punto de muestreo 9. Se indican las barras de error estándar en cada dato, la profundidad de inicio de la capa de rocas, arenas y arcillas, y la del nivel freático (límite entre la zona no saturada y saturada).

4.3.2. Perfiles fisiológicos

En la Figura 26 se muestran los resultados representados para cada uno de los grupos de actividades como porcentaje del total de intensidad de actividad. En general, se observaron patrones distintos según las muestras consideradas, pero dominaron las actividades relacionadas con el metabolismo de los ácidos carboxílicos y los polímeros.

En el punto de muestreo 1 dominó el metabolismo de los ácidos carboxílicos y los polímeros, con mayor intensidad conforme aumentó la profundidad. Para los primeros sustratos se produjo un incremento hasta los 10 m, que se mantuvo para volver a disminuir, y en los segundos se incrementó de manera constante con la profundidad. Los carbohidratos sufrieron una disminución de intensidad hasta el metro 10 y a partir de ahí se mantuvieron constantes; los aminoácidos disminuyeron en el primer metro y, aunque también bajaran en el metro 10, con la profundidad volvieron a incrementarse. Las aminas, por su parte, presentaron valores muy bajos, donde más hubo fue a los 15 m, aunque menos de un 5%, pero a partir de ahí se produce una disminución; y los fenólicos sufrieron una bajada muy brusca a los 5 m, y a partir de ahí desaparecieron.

En el punto de muestreo 2 se observó una dominancia de metabolismo de polímeros (Figura 26) que aumentaron con la profundidad hasta los 20 m, para luego disminuir y ya mantenerse estable, pero superando los valores de zonas más superficiales; en este caso, los ácidos carboxílicos dominaron menos, pero se incrementaron con la profundidad, salvo en los 20 m que sufrió una disminución desmesurada. Por su parte, con los carbohidratos ocurrió lo mismo que en el caso anterior: disminuyó su intensidad hasta los 15 m, y a partir de ahí se mantuvieron estables, siempre con menos del 10% del total de actividad; de forma general, los aminoácidos se mantuvieron constantes a lo largo del perfil, salvo a los 15 y 20 m donde la intensidad fue menor. En relación a las aminas, su proporción fue muy baja, excepto en el primer metro; y en los fenólicos, al igual que en el punto anterior, llegó a desaparecer su intensidad con la profundidad.

En el punto 3 ocurrió algo similar al primero (Figura 26): mayor dominancia de ácidos carboxílicos y polímeros, en el primer sustrato disminuyó a los 20 m pero recuperó los valores iniciales, y en el segundo, se incrementó con la profundidad, siendo a los 25 m donde menos había, pero volvió a aumentar. Los carbohidratos sufrieron altibajos a lo largo de este punto de muestreo, pero tendía a aumentar con la profundidad; los aminoácidos presentaron una mayor proporción en este caso, alcanzando el 20% de intensidad total, pero a partir de los 25 m disminuyeron. Las aminas tenían una baja proporción, excepto a los 5 y 25 m que alcanzaron o superaron el 10%; y los fenólicos casi desaparecieron con la profundidad pero a los 25 m tenían mayor proporción, y parecía que a los 40 m reaparecen.

En cuanto al punto de muestreo 4, de igual manera dominaron los ácidos carboxílicos y polímeros (Figura 26), el primero se redujo con la profundidad a partir de los 10 m, y el segundo mantuvo más del 40% de intensidad en todos los niveles de profundidad. Los carbohidratos por su parte, mantuvieron la intensidad a lo largo de todo el perfil; y los aminoácidos disminuyeron a los 5 m pero se recuperaron a los 25 m. En relación a las aminas casi desaparecieron tras el primer metro; y los fenólicos desaparecieron en zonas superficiales.

En el punto de muestreo 6 ocurrió lo mismo que en el anterior (Figura 26): dominancia de ácidos carboxílicos y polímeros en proporciones similares, mientras que los primeros disminuyeron muy suavemente con la profundidad, los segundos se incrementaron de la misma forma. Los carbohidratos aumentaron hasta el metro 10 pero decrecieron, manteniéndose ya constantes con la profundidad; y los aminoácidos se mantuvieron estables a lo largo de todo el perfil. Por su parte, las aminas presentaron una proporción muy pequeña, excepto en el metro 5, pero a mayores profundidades se incrementaron; y los fenólicos sí estuvieron más presentes en este caso.

Por su parte, el punto de muestreo 7 mostró que la intensidad de los ácidos carboxílicos fue algo menor, pero siguieron siendo de los más abundantes, si bien es cierto que disminuyeron con la profundidad, a los 10 m volvieron a aumentar; los polímeros fueron los más abundantes, salvo en los 5 m, donde todos los sustratos presentaron una proporción similar (Figura 26), y se incrementaron con la profundidad. Los carbohidratos sufrieron una disminución conforme aumentaba la profundidad, así como los aminoácidos. Las aminas también disminuyeron pero se encontraron ausentes en el primer metro; y los fenólicos tan sólo hicieron presencia en el metro 5.

En el punto de muestreo 8 se observó que hasta los 15 m los microorganismos con preferencia por los polímeros fueron los más abundantes, superando el 50%, pero a partir de los 15 m disminuyeron (Figura 26). En este caso, la afinidad hacia los ácidos carboxílicos se incrementó con la profundidad, rondando el 30% de proporción; mientras que hacia los carbohidratos se puede ver que también aumentó, llegando a superar el 20% en el metro 20. Por su parte, los aminoácidos disminuyeron a lo largo del perfil, sin llegar a superar en las zonas más profundas el 10% de proporción; las aminas siguieron siendo, junto con los fenólicos, el sustrato con menor preferencia por los microorganismos, disminuyendo el primero con la profundidad, y el segundo estando presente sólo a los 5 y 20 m.

Finalmente, en el punto de muestreo 9 se volvió a ver que los sustratos más preferidos por los microorganismos fueron los polímeros y ácidos carboxílicos (Figura 26), sufriendo ambos altibajos conforme se avanzaba hacia mayores niveles de profundidad, pero siempre estando por encima del 20% de proporción, cada uno. Por su parte, los carbohidratos, excepto en el metro 5 donde alcanzaron más del 10%, estaban poco presentes, sin llegar a superar el 5%;

los aminoácidos se mantuvieron estables, rondando el 10% de proporción en todos los niveles de profundidad; y las aminas y fenólicos no alcanzaron el 5%, aunque las primeras estuvieron más presentes que los segundos.

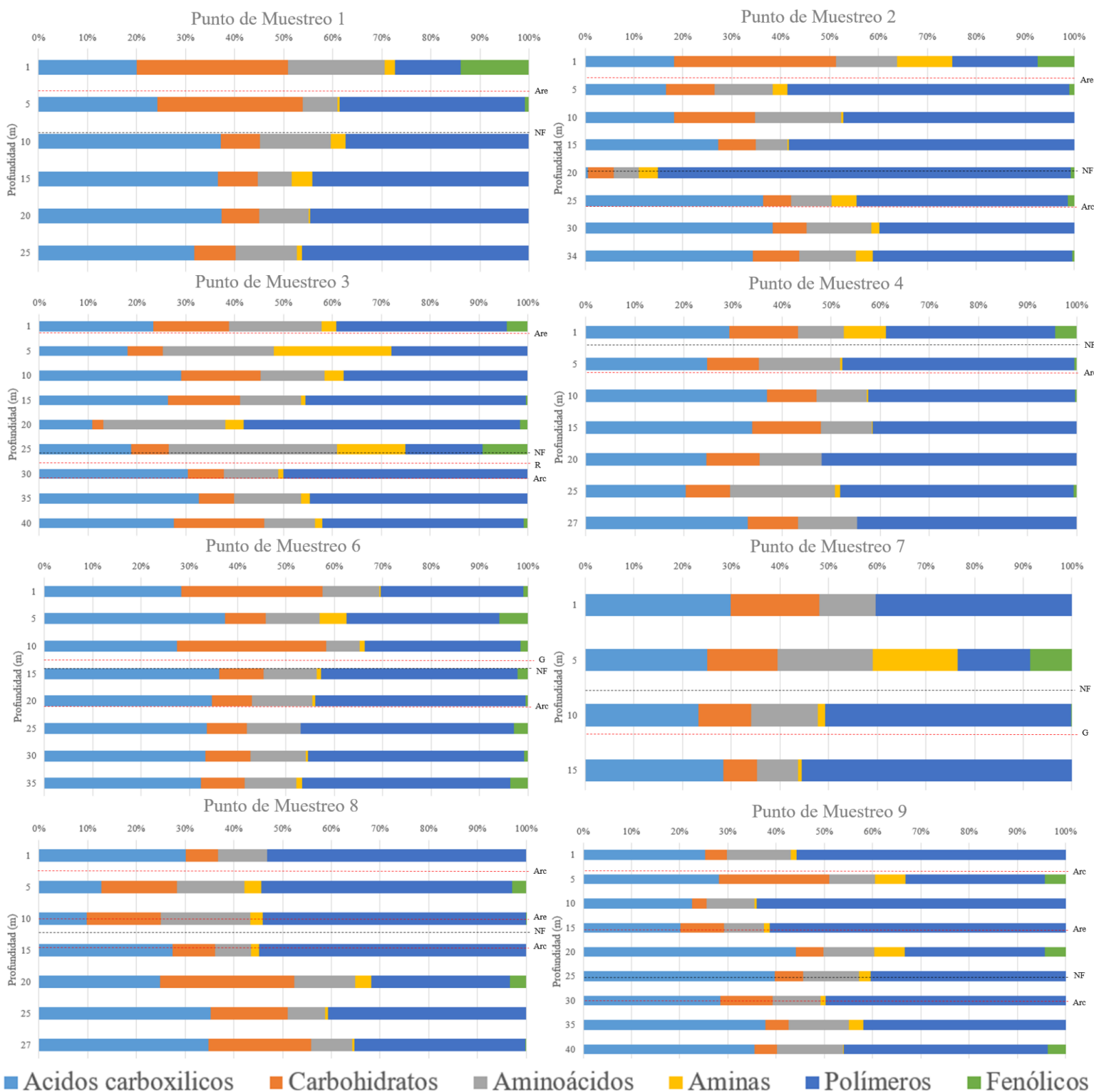


Figura 26. Perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (SAWCD) en función de la profundidad. Se indican la profundidad de inicio de la capa de arenas, rocas, gravas y arcillas, y la del nivel freático (límite entre la zona no saturada y saturada). Arc: Capa de Arcillas; Are: Capa de Arenas; R: Capa de Rocas; G: Capa de Gravas; NF: Nivel Freático.

4.4. Análisis de Correlación

Las matrices de correlación entre las variables analizadas se representan en las Figuras 27, 28 y 29, diferenciadas para el conjunto de datos en su totalidad, la zona no saturada y la zona saturada, respectivamente.

Considerando los datos globales (Figura 27), la correlación de las variables con la profundidad fue ligeramente negativa, excepto en la equidad (E), la intensidad de metabolización (SAWCD) de los ácidos carboxílicos y de los polímeros, y el contenido en materia orgánica. Las correlaciones fueron positivas y elevadas entre la intensidad de la actividad metabólica global (AWCD), la riqueza de sustratos (SR) y la biodiversidad funcional (H), y además con SAWCD de ácidos carboxílicos, carbohidratos y aminoácidos; así como entre H y SR. El índice de equidad (E) fue la única variable que presentó una correlación negativa con el resto, excepto con la profundidad y con la SAWCD de aminas, aunque no demasiado elevada. La materia orgánica no estuvo demasiado correlacionada con ninguno de los parámetros evaluados.

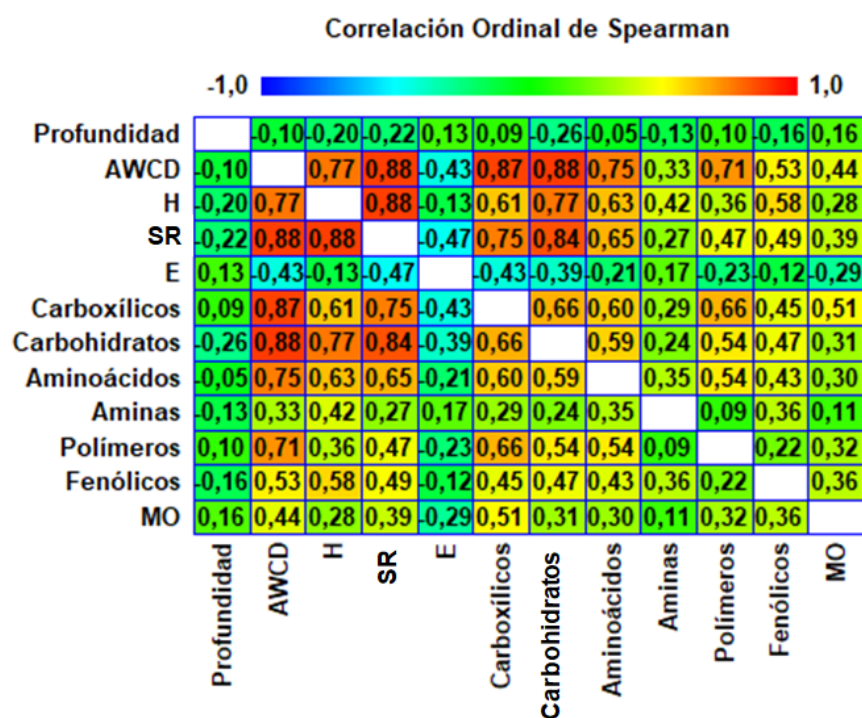


Figura 27. Análisis de correlación de las variables analizadas considerando los datos de todo el perfil. Se indica el coeficiente de correlación de Spearman.

La matriz de correlación de la zona no saturada mostró un patrón semejante al análisis global, aunque con correlaciones más altas entre algunas variables (Figura 28). La profundidad influyó negativa, aunque no significativamente, sobre todas las variables, excepto para la equidad (E). La intensidad de la actividad metabólica global (AWCD) se correlacionó positivamente con H, SR y SAWCD de ácidos carboxílicos, carbohidratos y aminoácidos. Del mismo modo, H con SR mostraron una correlación positiva y significativa; y la materia orgánica, salvo con la profundidad y E, las correlaciones fueron positivas, pero no altas.

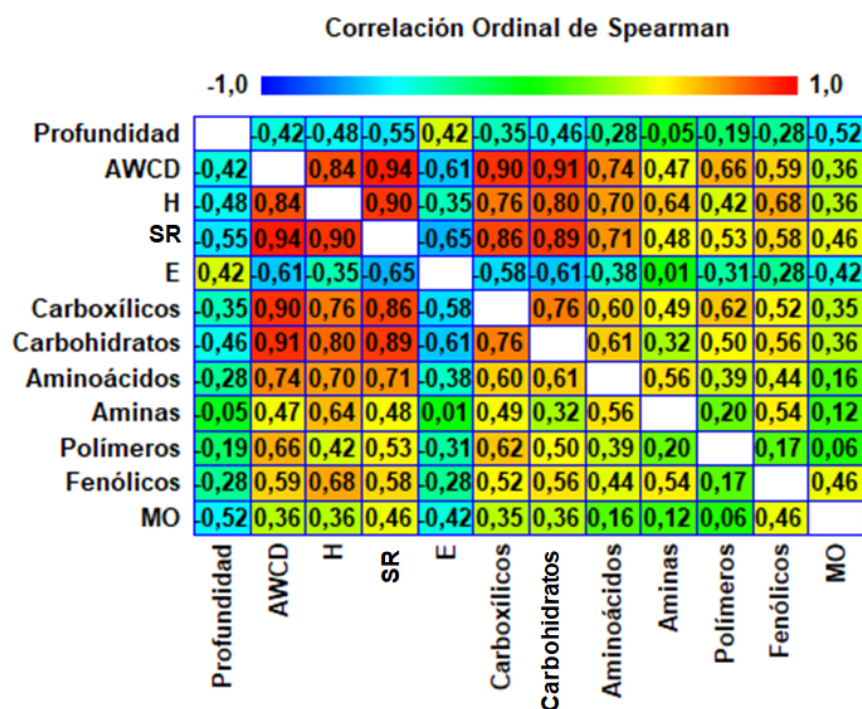


Figura 28. Análisis de correlación de las variables analizadas considerando los datos de la zona no saturada. Se indica el coeficiente de correlación de Spearman.

La matriz de correlación de la zona saturada mostró un patrón con menores correlaciones entre las variables consideradas (Figura 29). La profundidad influyó positivamente sobre todas las variables, destacando el contenido en materia orgánica, excepto para la equidad (E) y la actividad metabólica de aminas, aunque con coeficientes de correlación bajos. La intensidad de la actividad metabólica global (AWCD) se correlacionó positivamente con la de los ácidos carboxílicos, polímeros, carbohidratos y aminoácidos. Al igual que en los dos casos anteriores, H y SR también se correlacionaron positiva y significativamente.

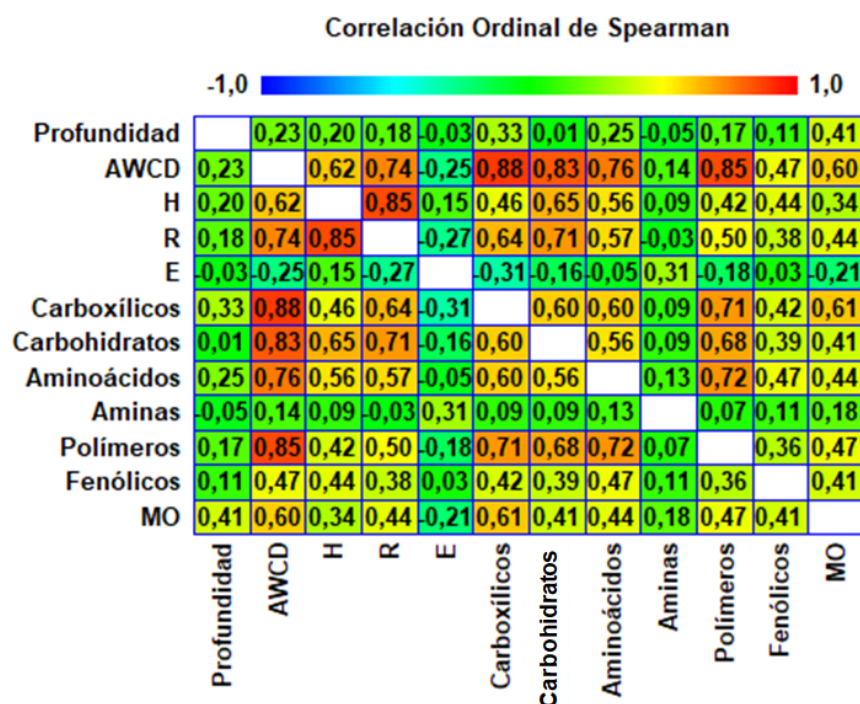


Figura 29. Análisis de correlación de las variables analizadas considerando los datos de la zona saturada. Se indica el coeficiente de correlación de Spearman.

De forma conjunta, en el análisis de correlación de las zonas no saturada y saturada, se observaron diferencias entre las correlaciones (Figuras 28 y 29). La correlación fue más intensa en la zona no saturada entre AWCD, H y SR; del mismo modo, las correlaciones de E con el resto de variables fueron mucho más negativas en dicha zona. Sin embargo, las correlaciones del contenido de materia orgánica con las demás variables fue superior en la zona saturada (Figura 29).

5. Discusión

El uso de las placas *Biolog Ecoplate*TM para estudiar el perfil fisiológico de las bacterias heterótrofas se ha aplicado en muchas disciplinas científicas (Baraza, *et al.*, 2019). En este estudio, en concreto, se han utilizado para comparar las comunidades microbianas de las zonas no saturada y saturada de la zona crítica terrestre (ZC). Para ello, se ha hecho un análisis del efecto de la profundidad y posición de puntos de muestreo (heterogeneidad vertical y horizontal, respectivamente), la naturaleza de los materiales geológicos (sobre todo en lo que respecta a su porosidad, grado de retención de materia orgánica y capacidad de transmisión de fluidos), y la diferencia entre las zonas mencionadas, sobre la diversidad funcional microbiana del sustrato. En lo que respecta a la variabilidad entre los puntos de muestreo analizados, se puede afirmar que, en general, todos siguieron una tendencia y valores muy similares en la mayoría de las variables consideradas, lo que dio consistencia a los resultados.

5.1. Patrón de la Materia Orgánica

La naturaleza y cantidad de materia orgánica que tenga el material del perfil condicionará la abundancia, función y actividad microbiana, ya que es la principal fuente de nutrientes de las

poblaciones microbianas heterótrofas (Contreras, 2020). Hay estudios que asocian la distribución vertical de los microorganismos con la disponibilidad de carbono orgánico del suelo (Blume *et al.*, 2002; Fierer, *et al.*, 2003; Eilers *et al.*, 2012) debido, principalmente, a la presencia de vegetación, tanto por parte de las raíces, como por parte de los restos vegetales. Por tanto, la abundancia y actividad microbiana se encuentran asociadas a los llamados puntos calientes de los suelos (Bundt *et al.*, 2001; Kuzyakov y Blagodatskaya, 2015).

El característico patrón en “V” observado en todo el perfil para el contenido en materia orgánica (mayores cantidades en los niveles superiores, una caída sustancial en los intermedios, para acabar subiendo hasta incluso superar los valores superficiales en los niveles más profundos, tanto en los datos en su conjunto como en la mayoría de los puntos de muestreo), señala la existencia de una cierta dinámica de distribución de la materia orgánica entre las zonas no saturada y saturada, con acumulaciones manifiestas hacia los niveles más profundos de la segunda. Este patrón determina a su vez el del resto de variables analizadas sobre la diversidad y actividad funcional microbiana.

La distribución de la materia orgánica en la zona no saturada (que disminuyó en profundidad) se explica en gran parte por la mayor concentración en el suelo y zona más superficial, derivada sobre todo de la producción vegetal aérea y de la rizosfera (Sheng *et al.*, 2021). En la zona saturada, el aumento de materia orgánica en profundidad puede deberse a la dominancia de arcillas en las zonas más profundas de los perfiles. De hecho, en 5 de los 8 puntos de muestreo hubo arcillas en estas zonas, que fueron aquellas donde más intenso fue este aumento de materia orgánica. La materia orgánica queda mejor retenida en las capas de arcilla (Zhang *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2016), debido principalmente a la elevada capacidad de absorción que presenta este material (Tang y Riley, 2014; Liu *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2016), lo que se manifestó en los mayores contenidos en materia orgánica registrados en estas, frente al resto de los materiales, más porosos y heterogéneos (arenas, gravas y roca). No obstante, y aunque en menor magnitud, en aquellos puntos de muestreo con materiales más porosos en profundidad también se detectó un incremento de la materia orgánica a mayores profundidades de la zona saturada. Además, si comparamos entre zonas no saturada y saturada, también se registró un aumento significativo de materia orgánica en la zona saturada frente a la no saturada, lo que sugiere que, aunque las arcillas retienen más materia orgánica, el papel del agua es importante a estos niveles como medio de transporte de solutos, energía y sedimentos a lo largo de la ZC (Wymore *et al.*, 2017), incluso a profundidades localizadas por debajo del acuífero, donde los materiales se comportarían como acuitardos, es decir, como materiales que contienen agua y la transmiten muy lentamente.

5.2. Patrones de la Actividad Metabólica

La riqueza en el uso de sustratos (SR) proporciona información sobre la potencial diversidad de la microbiota existente en cada zona. De forma previsible, la zona más diversa fue la no saturada, fundamentalmente por la alta riqueza microbiana concentrada en el suelo, ya que la humedad y el carbono orgánico de este son los principales impulsores de muchas funciones microbianas (FAO *et al.*, 2020). Por otra parte, el patrón general de riqueza microbiana fue similar al de la materia orgánica, con mayor riqueza en las zonas superiores de la zona no saturada y, lo que es más llamativo, también en las inferiores de la saturada. Esto indicaría presencia microbiana en las capas de acuitardos. Además, la semejante riqueza microbiana entre materiales más y menos porosos (arenas y gravas respecto a arcillas), sugiere una posible compensación entre el mayor contenido de materia orgánica de las arcillas y su menor capacidad de transferencia de fluidos, proceso esencial para la vida de los microorganismos (Lin, 2010; Phillips, *et al.*, 2019), y menor diversidad de nichos ecológicos, debido a su

homogeneidad. Los materiales más porosos facilitan el transporte de materia orgánica y, además, generan más variedad de nichos (Torsvik y Ovreas, 2002; Bardgett y Van der Putten, 2014), compensando así su menor cantidad de materia orgánica.

El similar patrón de la diversidad de Shannon (H) al de la riqueza de sustratos señala una alta distribución de recursos entre grupos funcionales microbianos, corroborado además con valores muy homogéneos de equidad (E) en prácticamente todos los perfiles, indicando un equilibrio entre las distintas actividades metabólicas. Esto se podría explicar por la existencia de variabilidad, tanto en la naturaleza de la materia orgánica como posiblemente en los nichos ecológicos.

Por un lado, la mayor diversidad observada en los primeros metros de la zona no saturada y los más profundos de la saturada responden al patrón de la materia orgánica, apoyando así la existencia de una materia orgánica diversa en ambas zonas como para sustentar grupos funcionales variados. Esto se corrobora por la correlación positiva entre materia orgánica y diversidad funcional, encontrada también en otros estudios (García *et al.*, 2018). El efecto de la diversidad de nichos ecológicos se justificaría en la zona no saturada, donde dominan los materiales más porosos y donde la escasez de agua y su distribución más heterogénea generaría una separación de nichos más pronunciada (Akob y Küsel, 2011). No obstante, este efecto se solaparía también con la cantidad de materia orgánica de los primeros metros de la zona no saturada, aunque este estudio no se ha diseñado para poder diferenciar ambos efectos.

En la zona saturada, con dominancia de arcillas, parece ser sólo la materia orgánica el factor que facilita dicha diversidad funcional, ya que los perfiles donde no hay arcillas también tienen menor cantidad de materia orgánica y menor diversidad (puntos de muestreo 1, 4 y 7). De hecho, se han establecido correlaciones positivas entre la diversidad microbiana y el contenido en arcilla en el perfil (Sheng *et al.*, 2021).

El patrón general en “V” también se manifestó en la intensidad de la actividad metabólica (AWCD), en este caso sin diferencias entre la zona no saturada y saturada. Esto señalaría que, a pesar de que la diversidad microbiana disminuyó en la zona saturada, la disponibilidad de materia orgánica aquí parece permitir la existencia de una actividad microbiana semejante a la de los niveles más superficiales de la zona no saturada, hecho que se suma a la mayor y equivalente actividad metabólica obtenida en los materiales roca (más superficial, de origen edáfico) y arcillas de la zona saturada. Las fuertes correlaciones positivas halladas entre riqueza de sustratos, diversidad e intensidad metabólica, tanto en todo el perfil (Figura 27) como en la zona no saturada (Figura 28) están acordes a los resultados de otros estudios donde se observan los valores más altos de AWCD acompañados por una mayor riqueza de la comunidad microbiana (Garau *et al.*, 2011). Esto no sucede en la zona saturada, probablemente porque sus condiciones ambientales, bastante más homogéneas, simplifican la diversidad de nichos.

Por otra parte, las débiles correlaciones positivas halladas entre el contenido en materia orgánica y la intensidad de la actividad metabólica contrastan con las altas correlaciones de otros estudios (García, *et al.*, 2018). Si analizamos el comportamiento de prácticamente todas las variables en la zona no saturada, se observa un brusco descenso entre la zona edáfica (rica en materia orgánica y en actividad metabólica) y la zona más profunda (muy pobre en materia orgánica y actividad metabólica), sin gradiente de disminución. Algo semejante sucedió en la zona saturada, pero a la inversa, con una fuerte acumulación de materia orgánica en las capas más profundas. En definitiva, la dinámica de las variables no sigue un modelo lineal, por lo que las correlaciones no parecen expresar adecuadamente el fenómeno observado.

Polímeros y ácidos carboxílicos fueron los sustratos más abundantes en los perfiles analizados (Figura 26), seguidos de carbohidratos y aminoácidos, y todos siguieron un patrón en profundidad similar al del contenido en materia orgánica. Respecto a la abundancia relativa de los sustratos, nuestros resultados difieren de un estudio realizado en siete bosques del mundo, con diversidad climática, donde el orden del uso de los seis distintos tipos de sustrato fue el mismo: ácidos carboxílicos, aminoácidos, carbohidratos, polímeros, aminas y fenólicos (Fang *et al.*, 2014), aunque este no se realizó a grandes profundidades.

La actividad metabólica sobre los polímeros destacó por alcanzar los máximos a mayores profundidades de la zona saturada, incluso más que la parte edáfica de la zona no saturada, mientras que para los ácidos carboxílicos fue semejante en ambas zonas. Los polímeros son moléculas complejas (en el suelo son sobre todo celulosa, lignina y quitina, entre otros). La menor cantidad de actividad sobre polímeros en superficie se puede deber a que, en zonas áridas, su descomposición en superficie es muy rápida, facilitada sobre todo por la fotodegradación, mecanismo que ha sido identificado como esencial en la dinámica del carbono en ecosistemas áridos (Austin y Vivanco, 2006). Además, es posible que las particulares condiciones ambientales de la zona saturada favorezcan su acumulación y, en consecuencia, la potencial actividad microbiana para su descomposición.

Por otro lado, se ha visto que en las islas de recursos de zonas áridas donde el contenido de materia orgánica es menor, se metabolizan preferentemente los carbohidratos simples y los ácidos carboxílicos más que los grupos más complejos como aminas, amidas y polímeros (García *et al.*, 2018). El aumento de polímeros en profundidad podría estar indicando una cierta limitación de materia orgánica en el ecosistema analizado, que hace que la comunidad microbiana manifieste menor capacidad para metabolizar diferentes sustratos de carbono, que finalmente acaban acumulados en el subsuelo. El azufair es un ecosistema que alcanza su límite de distribución septentrional en el contorno mediterráneo, experimentando actualmente una importante reducción de su área y deterioro de su hábitat, sobre todo como consecuencia de las actividades humanas (Guirado *et al.*, 2018; Rey *et al.*, 2018). Su condición relictica en la zona podría estar afectando a la producción de materia orgánica y, en definitiva, a la actividad microbiana.

Por otra parte, los ácidos carboxílicos representan una parte importante de la fracción hidrosoluble de las moléculas orgánicas liberadas en la rizosfera, desempeñando un papel decisivo en la disponibilidad de nutrientes, la ecología y la productividad del suelo (Adeleke *et al.*, 2017). El uso de estos sustratos está dramáticamente influenciado por la vegetación y la profundidad del suelo (Yu y Steinberger, 2011); aunque su origen sea diverso, desde exudados radicales a derivados de la actividad bacteriana, algal, líquénica y fúngica (Adeleke *et al.*, 2017), están muy ligados a la parte edáfica de la zona no saturada. Los patrones funcionales de ambos polímeros y ácidos carboxílicos constatan de nuevo la capacidad de los materiales finos y poco porosos (arcillas) para acumular ambos tipos de materia orgánica. A nivel edáfico se ha visto que el uso de grupos carboxílicos y polímeros se mantiene a niveles altos en suelos más arcillosos, a diferencia de los arenosos (Feigl *et al.*, 2017); esto sugiere que en los primeros se crea un ambiente más favorable para determinados grupos microbianos que utilicen estos sustratos específicos (Garau *et al.*, 2011), incluso a profundidades más allá del suelo. Además, los resultados contrastan con los de Yu y Steinberger (2011), en los que se afirma que existe una correlación negativa entre la diversidad funcional microbiana y el uso de sustratos, es decir, una mayor dominancia de un sustrato concreto conlleva una menor diversidad funcional; mientras que los nuestros demuestran que dicha correlación es positiva en las dos zonas (Figuras 28 y 29).

El comportamiento de la actividad metabólica sobre carbohidratos, aminoácidos, aminas y compuestos fenólicos, con máximos en los extremos del perfil y mayor actividad en la zona saturada, señala la alta actividad de la parte edáfica. La mayoría de carbohidratos, aminoácidos y aminas son sustratos intermedios resultado de la degradación de materia orgánica más compleja, lo que explica la elevada afinidad de las bacterias por estos tipos de sustratos (Kenarova *et al.*, 2014; Feigl *et al.*, 2017). Al ser los compuestos orgánicos más lábiles, son fácilmente degradados por los microorganismos en sustancias metabolizables, más asimilables para los organismos del suelo (LarréLarrouy *et al.*, 2004). Las bacterias edáficas son las principales descomponedoras de carbohidratos simples, ácidos orgánicos y aminoácidos (Fang *et al.*, 2014). A su vez, los microorganismos sintetizan principalmente polímeros de hexosas y los liberan al suelo (Ratnayake *et al.*, 2013).

Guggenberger *et al.* (1994) y Amelung *et al.* (1997) demostraron que los azúcares derivados de las plantas se concentran en la parte arenosa del suelo, mientras que los carbohidratos derivados de los microorganismos se acumulan en la fracción más arcillosa. En equivalencia a lo señalado, es posible que la actividad metabólica de la zona más profunda de la zona saturada se deba por una parte al lavado de los carbohidratos, aminoácidos y aminas del suelo, y por otra, al menos en lo que respecta a los carbohidratos, a su síntesis microbiana in situ.

Los compuestos fenólicos abarcan un grupo muy heterogéneo de sustancias que suelen ser metabolitos secundarios de origen vegetal (Lincoln y Zeiger, 2006), por lo que su cantidad y respuesta funcional de la microbiota puede ser diversa. Aún así, el semejante patrón vertical al de sustratos más abundantes apuntala el resultado general. Meng *et al.* (2019) indican que el crecimiento estimulado de microorganismos que se nutren de carbohidratos, junto con polímeros, puede conducir a un incremento de la actividad microbiana y a una disminución de la diversidad funcional de la comunidad; esto es cierto parcialmente, es decir, los resultados muestran que los carbohidratos siguen un patrón similar al de la actividad metabólica, pero los polímeros y diversidad no.

5.3. Efectos del Cambio Climático sobre la Comunidad Microbiana de la ZC

La actividad microbiana juega un papel muy importante en los intercambios de carbono suelo-vegetación-atmósfera (Classen *et al.*, 2015). En un futuro no muy lejano, los resultados obtenidos podrían verse alterados por los efectos del calentamiento global, en el sentido de que las comunidades microbianas de este tipo de regiones se podrán ver transformadas (Tecon y Or, 2017), ya que son muy sensibles a cambios térmicos (Classen *et al.*, 2015). Dichos efectos redundarán en una alteración de la composición de las comunidades microbianas (Zogg *et al.*, 1997), o que su respuesta ante el calentamiento no se vea durante años (Rinnan *et al.*, 2007, 2013). En este sentido, según la FAO (2020), las distribuciones actuales de las bacterias del suelo tienen relaciones más fuertes con el clima que había hace 50 años que con el actual; este retraso es probablemente debido al tiempo que tardan las propiedades del suelo en adaptarse a los cambios en el clima.

A pesar de esto, las comunidades edáficas que estén bien adaptadas a la baja disponibilidad de agua o a ciclos repetidos de sequía pueden sufrir menos ante los regímenes hídricos cambiantes (Evans *et al.*, 2011), esto podría ocurrir en la zona de realización de este estudio. Sin embargo, los cambios en la comunidad microbiana del suelo inducidos por el cambio climático pueden tener efectos duraderos sobre el rendimiento y/o establecimiento de las plantas y el equilibrio de carbono del suelo (Classen *et al.*, 2015). Será necesario comprender

cómo interaccionan los microorganismos de la ZC, y en concreto de las zonas no saturada y saturada, entre sí y con la vegetación con la que están en contacto (Classen *et al.*, 2015), ya que en ambas zonas se encuentran estructurados por condiciones ambientales diferentes (Fierer y Jackson, 2006). Es por ello por lo que las presiones a las que se ve sometida la vegetación pueden ser distintas a las que se enfrentan las comunidades microbianas de las zonas no saturada y saturada (Classen *et al.*, 2015). Sin embargo, en algunos casos esta microbiota es capaz de cambiar su distribución a lo largo del perfil (Classen *et al.*, 2015).

En el caso de los puntos de muestreo que se encuentran cercanos a individuos de *Z. lotus*, la comunidad bacteriana asociada a las raíces se podría ver afectada por el cambio climático. Así por ejemplo, se ha demostrado que los rizobios (bacterias asociadas a las raíces de las plantas) pueden volverse asíncronos, es decir, adelantar sus ciclos vitales, como consecuencia de incrementos térmicos (Classen *et al.*, 2015). Dichos cambios pueden generar alteraciones en la comunidad vegetal y, por tanto, afectar a la productividad ecosistémica (Classen *et al.*, 2015). Una rápida adaptación de las comunidades bacterianas puede permitir la supervivencia de especies vegetales determinadas que son más vulnerables al cambio climático (Lau y Lennon, 2012). A pesar de esto, la mayor ocurrencia de eventos como olas de calor o sequías pueden alterar las propiedades físicas y biológicas de los suelos (Ajwa *et al.*, 1999; Certini, 2005; Yuste *et al.*, 2014). En este sentido, y dada la alta diversidad funcional hallada en la zona de estudio, queda aún mucho trabajo por hacer para conocer la diversidad microbiana de las zonas áridas, sus interacciones con la vegetación y su vulnerabilidad al cambio climático.

6. Conclusiones

Los resultados de este trabajo permitieron obtener las siguientes conclusiones:

1. Este estudio ha profundizado en el conocimiento de la diversidad metabólica de los microorganismos heterótrofos de la zona crítica, demostrando que existen diferencias entre las zonas no saturada y saturada. Sorprendentemente las mayores profundidades estudiadas de la zona saturada parecen disponer de recursos suficientes como para soportar una actividad microbiana equivalente a la de las áreas edáficas de la zona no saturada.
2. En la parte edáfica de la zona no saturada, la diversidad microbiana funcional es más elevada, como era de esperar, que en el resto de la zona no saturada, y en esta es más heterogénea entre las diferentes profundidades analizadas, lo que señalaría una mayor separación de nichos y diversidad de hábitats, probablemente por limitación del agua como factor que conecta poros y distribuye organismos, condiciones también favorecidas por la naturaleza más porosa de los materiales.
3. La previsible disminución de la actividad metabólica en profundidad por reducción de recursos y modificación del nivel de complejidad del hábitat y de las condiciones ambientales no respondió a lo esperado: en la zona no saturada se cumplió, mientras que en la saturada hubo un aumento de la cantidad de materia orgánica y diversidad de capacidades microbianas de metabolización de fracciones de la misma a mayores profundidades, que permitiría soportar una elevada diversidad funcional microbiana.
4. Este estudio es pionero en lo que respecta al análisis de la funcionalidad microbiana a tanta profundidad, y en regiones semiáridas, pero sería necesario profundizar en este campo de investigación y con este enfoque, para así tener una idea más clara sobre cómo funcionan los microorganismos en la zona crítica terrestre, cuál es su contribución en el ciclo del carbono y en otros ciclos biogeoquímicos y, en definitiva, valorar las funciones y servicios que provee la biodiversidad de la zona crítica en zonas áridas y en qué magnitud se verá afectada por los efectos del cambio climático.

7. Bibliografía y Webgrafía

- Adeel, Z., Safriel, U., Niemeijer, D. y White, R. (2005). Ecosystems and human well-being: desertification synthesis. *World Resources Institute*, Washington DC.
- Adeleke, R., Nwangburuka C. y Oboirien, B. (2017). Origins, roles and fate of organic acids in soils: A review. *South African Journal of Botany*, 108: 393-406.
- Ajwa, H. A., Dell, C. J. y Rice, C. W. (1999). Changes in enzyme activities and microbial biomass of tallgrass prairie soil as related to burning and nitrogen fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 769-777.
- Akob, D. M. y Küsel, K. (2011). Where microorganisms meet rocks in the Earth's Critical Zone. *Biogeosciences*, 8: 3531-3543.
- Allan, E., Manning, P., Alt, F., Binkenstein, J., Blaser, S., Bluthgen, N., ... Fischer, M. (2015). Land use intensification alters ecosystem multifunctionality via loss of biodiversity and changes to functional composition. *Ecology Letters*, 18: 834-843.
- Amelung, W., Flach, K. W. y Zech, W. (1997). Climate effects on soil organic matter composition of the Great Plains. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 61: 115-123.
- Anderson, S. P., Bales, R. C. y Duffy, C. J. (2008). Critical Zone Observatories: Building a network to advance interdisciplinary study of Earth surface processes. *Mineral. Mag.*, 72: 7-10.
- Austin, A. T. y Vivanco, L. (2006). Plant litter decomposition in a semi-arid ecosystem controlled by photodegradation. *Nature*, 442: 555-558.
- Bachar, A., Soares, M. y Gillor, O. (2012). The effect of resource islands on abundance and diversity of bacteria in arid soils. *Microbial Ecology*, 63 (3): 694-700.
- Banwart, S. A., Chorover, J., Gaillardet, J., Sparks, D., White, T., Anderson, S., ... Ragnarsdottir, K. (2013). *Sustaining Earth's critical zone. Basic science and interdisciplinary solutions for global challenges*. Universidad de Sheffield. Banwart S. A. ISBN: 978-0-9576890-0-8.
- Baraza, E., Bota, J., Romero-Munar, A. y Nogales, B. (2019). Aplicación de la técnica Biolog™ ECO-plate para el estudio del perfil fisiológico de las comunidades microbianas del suelo agrícola. *Ecosistemas*, 28 (3): 46-53.
- Barberán, A., Ladau, J., Leff, J. W., Pollard, K. S., Menninger, H. L., Dunn, R. R. y Fierer, N. (2015). Continental-scale distributions of dust-associated bacteria and fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: 5756-5761.
- Bardgett, R. D. y Van der Putten, W. H. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, 515: 505-511.
- Bashan, Y. y de Bashan, L. E. (2010). Microbial populations of arid lands and their potential for restoration of deserts. En P. Dion (Ed.), *Soil biology and agriculture in the tropics (Soil Biology Series 21. Chapter 6* (pp. 109-137). Berlin, Heidelberg, Germany: Springer. ISBN: 978-3-642-26261-6.

- Ben-David, E., Zaady, E., Sher, Y. y Nejidat, A. (2011). Assessment of the spatial distribution of soil microbial communities in patchy arid and semi-arid landscapes of the Negev Desert using combined PLFA and DGGE analyses. *Microbiol. Ecol.*, 76: 492-503.
- Berg, N. y Steinberger, Y. (2008). Role of perennial plants in determining the activity of the microbial community in the Negev Desert ecosystem. *Soil. Biol. Biochem.*, 40: 2686–2695.
- Bernasconi, S. M. (2014). Measuring the Critical Zone: Lessons from the Damma Glacier Critical Zone Observatory. *Procedia Earth Planet. Sci.*, 10: 38-45.
- Blume, E., Bischoff, M., Reichert, J. M. *et al.* (2002). Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season. *Appl. Soil Ecol.*, 20: 171-81.
- Brantley, S. L., Di Biase, R. A., Russo, T. A., Shi, Y., Lin, H. y Davis, K. *et al.* (2016). Designing a suite of measurements to understand the Critical Zone. *Earth Surf. Dyn.*, 4: 211-235.
- Brantley, S. L., White, T. S., White, A. F., Sparks, D., Richter, D., Pregitzer, K., ... Amundson, R. (2006). Frontiers in exploration of the critical zone: Report of a workshop sponsored by the National Science Foundation. *Newark, DE*, pp. 30.
- Brooks, P. D., Chorover, J., Fan, Y., Godsey, S. E., Maxwell, R. M., McNamara, J. P. y Tague, C. (2015). Hydrological partitioning in the critical zone: Recent advances and opportunities for developing transferable understanding of water cycle dynamics. *Water Resources Research*, 51: 6973–6987.
- Bundt, M., Widmer, F., Pesaro, M., *et al.* (2001). Preferential flow paths: biological ‘hot spots’ in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 33: 729-38.
- Cardinale, B. J., Duffy, J. E., Gonzalez, A., Hooper, D. U., Perrings, C., Venail, P., ... Naeem, S. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486: 59-67.
- Cardon, Z. G., Stark, J. M., Herron, P. M. y Rasmussen, J. A. (2013). Sagebrush car-rying out hydraulic lift enhances surface soil nitrogen cycling and nitrogen uptake into inflorescences. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 110: 18988-18993.
- Certini, G. (2005). Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia*, 143: 1-10.
- Cheng, X., Yang, Y., Li, M., Dou, X. y Zhang, Q. (2013). The impact of agricultural land use changes on soil organic carbon dynamics in the Danjiangkou Reservoir area of China. *Plant and Soil*, 366: 415-424.
- Classen, A. T., Sundqvist, M. K., Henning, J. A., Newman, G. S., Moore, J. A. M., Cregger, M. A., Moorhead, L. C. y Patterson, C. M. (2015). Direct and indirect effects of climate change on soil microbial and soil microbial-plant interactions: What lies ahead? *Ecosphere*, 6 (8): 130.
- Coleman, D., Callahan, M. A. y Crossley, D. A. (2018). *Fundamentals of soil ecology*. Athens, GA, United States. Academic Press. ISBN: 978-0-12-805251-8.

- Contreras, A. (2020). *Microbiota aerobia cultivable asociada al complejo ecohidrológico del azufaífo: distribución en el perfil vertical*. (Trabajo Fin de Grado inédito). Universidad de Almería. Almería.
- Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Reich, P. B., Jeffries, T. C., Gaitan, J. J., Encinar, D., Berdugo, M., Campbell, C. D. y Singh, B. K. (2016). Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature Communications*, 7: 10541.
- Eilers, K., Debenport, S., Anderson, S. y Fierer, N. (2012). Digging deeper to find unique microbial communities: the strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil. *Soil. Biol. Biochem.*, 50: 58-65.
- Evans, S. E., Byrne, K. M., Lauenroth, W. K. y Burke, I. C. (2011). Defining the limit to resistance in a drought-tolerant grassland: long-term severe drought significantly reduces the dominant species and increases ruderals. *Journal of Ecology*, 99: 1500-1507.
- Evaristo, J. y McDonnell, J. J. (2017). Prevalence and magnitude of groundwater use by vegetation: a global stable isotope meta-analysis. *Scientific Reports*, 7 (1): 44110.
- Fang, H., Cheng, S., Wang, Y., Yu, G., Xu, M., Dang, X., Li, L. y Wang, L. (2014). Changes in soil heterotrophic respiration, carbon availability, and microbial function in seven forests along a climate gradient. *Ecol. Res.*, 29: 1077-1086.
- FAO, ITPS, GSBI, SCBD y EC. (2020). *State of knowledge of soil biodiversity - Status, challenges and potentialities, Report 2020*. Roma, FAO.
- Feigl, V., Ujaczki, E., Vaszita, E. y Molnár, M. (2017). Influence of red mud on soil microbial communities: Application and comprehensive evaluation of the *Biolog EcoPlate* approach as a tool in soil microbiological studies. *Science of the Total Environment*, 595: 903-911.
- Field, J. P., Breshears, D., Darin, J., Villegas, J., López-Hoffman, L., Brooks, P., ... Troch, P. (2015). Critical zone services: expanding context, constraints, and currency beyond ecosystem services. *Vadose Zone Journal*, 14 (1): vzj2014.10.0142 p. 1-7.
- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15: 579-590.
- Fierer, N. y Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103: 626-631.
- Fierer, N., Schimel, J. P., y Holden, P. A. (2003). Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biol. Biochem.*, 35: 167-76.
- Gao, S., Ye, X., Chu, Y. y Dong, M. (2010). Effects of biological soil crusts on profile distribution of soil water, organic carbon and total nitrogen in Mu Us Sandland, China. *J. Plant Ecol.*, 3 (4): 279-284.
- Garau, G., Castaldi, P., Santona, L., Deiana, P. y Melis, P. (2007). Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization, culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil. *Geoderma*, 142: 47-57.

- Garau, G., Silveti, M., Deiana, S., Deiana, P., y Castaldi, P. (2011). Long-term influence of red mud on As mobility and soil physico-chemical and microbial parameters in a polluted sub-acidic soil. *J. Hazard. Mater.*, 185 (2–3): 1241-1248.
- García, D., López, B., de-Bashan, L., Hirsch, A., Maymon, M. y Bashan, Y. (2018). Functional metabolic diversity of the bacterial community in undisturbed resource island soils in the southern Sonoran Desert. *Land Degradation and Development*, 29 (5): 1467-1477.
- Garland, J. L. (1997). Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 24: 289-300.
- Goberna, M., Pascual, J. A., García, C. y Sánchez, J. (2007). Do plant clumps constitute microbial hotspots in semiarid Mediterranean patchy landscapes? *Soil Biol. Biochem.*, 39: 1047-1054.
- Gryta, A., Frąc, M. y Oszust, K. (2014). The application of the *Biolog EcoPlate* approach in ecotoxicological evaluation of dairy sewage sludge. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 174: 1434–1443.
- Guggenberger, G., Christensen, B. T. y Zech, W. (1994). Land use effects on the composition of organic matter in soil particle size separates I. Lignin and carbohydrate signature. *Eur. J. Soil. Sci.*, 45: 449-458.
- Guirado, E., Alcaraz- Segura, D., Rigol- Sánchez, J. P., Gisbert, J., Martínez- Moreno, F. J., Galindo-Zaldívar, J., González- Castillo, L. y Cabello, J. (2018). Remote-sensing-derived fractures and shrub patterns to identify groundwater dependence. *Ecohydrology*, 11: e1933.
- Hultine, K. R., Froend, R., Blasini, D., Bush, S. E., Karlinski, M. y Koepke, D. F. (2020). Hydraulic traits that buffer deep-rooted plants from changes in hydrology and climate. *Hydrological Processes*, 34: 209-222.
- Jansson, J. K. y Prosser, J. I. (2013). Microbiology: the life beneath our feet. *Nature*, 494: 40-41.
- Jia, G., Liu, B., Wang, G. y Zhang, B. (2010). The microbial biomass and activity in soil with shrub (*Caragana korshinskii* K.) plantation in the semi-arid loess plateau in China. *European Journal of Soil Biology*, 46: 6-10.
- Jin, L., Ravella, R., Ketchum, B., Bierman, P. R., Heaney, P., White, T. y Brantley, S. L. (2010). Mineral weathering and elemental transport during hillslope evolution at the Susquehanna/Shale Hills Critical Zone Observatory. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 74: 3669–3691.
- Kenarova, A., Radeva, G., Traykov, I. y Boteva, S. (2014). Community level physiological profiles of bacterial communities inhabiting uranium mining impacted sites. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 100: 226-232.
- Kuzyakov, Y. y Blagodatskaya, E. (2015). Microbial hotspots and hot moments in soil: concept and review. *Soil Biol. Biochem.*, 83: 184-99.
- Lan, S., Thomas, A., Tooth, S., Wu, L. y Elliott, D. (2021). Effects of vegetation on bacterial communities, carbon and nitrogen in dryland soil surfaces: implications for shrub

- encroachment in the southwest Kalahari. *Science of the Total Environment*, 764: 142847.
- LarréLarrouy, M. C., Blanchart, E., Albrecht, A. y Feller, C. (2004). Carbon and monosaccharides of a tropical Vertisol under pasture and market gardening: distribution in secondary organomineral separates. *Geoderma*, 119: 163-178.
- Lau, J. A. y Lennon, J. T. (2012). Rapid responses of soil microorganisms improve plant fitness in novel environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109: 14058-14062.
- Lin, H. (2010). Earth's Critical Zone and hydrogeology: concepts, characteristics, and advances. *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 14: 25–45.
- Lin, H., Hopmans, J. W. y Richter, D. (2011). Interdisciplinary sciences in a global network of Critical Zone Observatories. *Vadose Zone J.*, 10: 781-782.
- Lincoln, T. y Zeiger, E. (2006). Secondary Metabolites and Plant Defense. En: Lincoln, T. y Zeiger, E., *Plant Physiology*, 4ª Ed. Capítulo 13. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts U.S.A.
- Liu, D., Zhang, Q., Wu, L., Zeng, Q., Dong, H., Bishop, M.E., *et al.* (2016). Humic acid-enhanced illite and talc formation associated with microbial reduction of Fe (III) in nontronite. *Chem. Geol.*, 447: 199-207.
- Makhalanyane, T. P., Valverde, A., Gunnigle, E., Frossard, A., Ramond, J.-B. y Cowan, D. A. (2015). Microbial ecology of hot desert edaphic systems. *FEMS Microbiology Reviews*, 39: 203-221.
- Meinzer, O. E. (1927). *Plants as indicators of groundwater*. U. S. Geological Survey, Water-Supply Paper 577. U. S. Government Printing Office, Washington, D.C., USA.
- Meng, K., Ren, W., Teng, Y., Wang, B., Han, Y., Christie, P. y Luo, Y. (2019). Application of biodegradable seedling trays in paddy fields: Impacts on the microbial community. *Science of the Total Environment*, 656: 750-759.
- Meyer, S. T., Ptacnik, R., Hillebrand, H., Bessler, H., Buchmann, N., Ebeling, A., ... Weisser, W. W. (2018). Biodiversity–multifunctionality relationships depend on identity and number of measured functions. *Nature Ecology & Evolution*, 2: 44-49.
- NRC, National Research Council (2001). *Basic Research Opportunities in Earth Science*. Washington, DC: The National Academies Press.
- Nemergut, D. R., Costello, E. K., Hamady, M., Lozupone, C., Jiang, L., *et al.* (2011). Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environ. Microbiol.*, 13: 135–14.
- Pasternak, Z., Al-Ashhab, A., Gatica, J., Gafny, R., Avraham, S., Minz, D., Gillor, O. y Jurkevitch, E. (2013). Spatial and temporal biogeography of soil microbial communities in arid and semiarid regions. *PLoS ONE*, 8 (7): e69705.
- Phillips, J. D., Pawlik, L. y Šamonil, P. (2019). Weathering fronts. *Earth-Science Reviews*, 198: 102925.

- Rasmussen, C., Troch, P. A., Chorover, J., Brooks, P., Pelletier, J. y Huxman, T. E. (2010). An open system framework for integrating critical zone structure and function. *Biogeochemistry*, 102 (1): 15-29.
- Ratnayake, R. R., Seneviratne, G. y Kulasooriya, S. A. (2013). Effect of Soil Carbohydrates on Nutrient Availability in Natural Forests and Cultivated Lands in Sri Lanka. *Eurasian Soil Science*, 46 (5): 579-586.
- Rey, P. J., Cancio, I., Manzaneda, A.J., González-Robles, A., Valera, F., Salido, T. y Alcántara, J. M. (2018). Regeneration of a keystone semiarid shrub over its range in Spain: habitat degradation overrides the positive effects of plant–animal mutualisms. *Plant Biology*, 20: 1083-1092.
- Reynolds, J. F., Smith, D. M. S., Lambin, E. F., Turner II, B. L., Mortimore, M., Batterbury, S. P. J., ... Walker, B. (2007). Global desertification: building a science for dryland development. *Science*, 316: 847-851.
- Richter, D. y Billings, S. A. (2015). ‘One physical system’: Tansley’s ecosystem as Earth’s critical zone. *New Phytologist*, 206 (3).
- Rinnan, R., Michelsen, A. y Baath, E. (2013). Fungi benefit from two decades of increased nutrient availability in tundra heath soil. *PLoS One* 8:10.
- Rinnan, R., Michelsen, A., Baath, E. y Jonasson, S. (2007). Fifteen years of climate change manipulations alter soil microbial communities in a subarctic heath ecosystem. *Global Change Biology*, 13: 28-39.
- Scott, R. L., Cable, W. L. y Hultine, K. R. (2008). The ecohydrologic significance of hydraulic redistribution in a semiarid savanna: hydraulic redistribution in a semiarid savanna. *Water Resources Research*, 44: W02440.
- Seuradge, B. J., Oelbermann, M. y Neufeld, J. D. (2017). Depth-dependent influence of different land-use systems on bacterial biogeography. *FEMS. Microbiol. Ecol.*, 93 (2): fiw239.
- Sheng, Y., Li, G., Dong, H., Liu, Y., Ma, L., Yang, M., ... Zhang, D. (2021). Distinct assembly processes shape bacterial communities along unsaturated, groundwater fluctuated, and saturated zones. *Science of the Total Environment*, 761 (3): 143303.
- Shi, L., Dong, H., Reguera, G., Beyenal, H., Lu, A., Liu, J., *et al.* (2016). Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. *Nat. Rev. Microbiol.*, 14: 651-662.
- Stone, M. M., DeForest, J. I. y Plante, A. F. (2014). Changes in extracellular enzyme activity and microbial community structure with soil depth at the Luquillo Critical Zone Observatory. *Soil. Biol. Biochem.*, 75: 237-247.
- Tang, J. y Riley, W. J. (2014). Weaker soil carbon-climate feedbacks resulting from microbial and abiotic interactions. *Nat. Clim. Chang.*, 5: 56-60.
- Tecon, R. y Or, D. (2017). Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil. *FEMS Microbiology Reviews*, 41 (5): 599-623.

- Thomas, A. D., Dougill, A. J., Elliott, D. R. y Mairs, H. (2014). Seasonal differences in soil CO₂ efflux and carbon storage in Ntwetwe Pan, Makgadikgadi Basin, Botswana. *Geoderma*, 219-220: 72–81.
- Tilman, D., Isbell, F. y Cowles, J. M. (2014). Biodiversity and ecosystem functioning. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45: 471-493.
- Tirado, R., 2009. 5220 Matorrales arborescentes con Ziziphus (*) (Disponible: http://www.jolube.es/Habitat_Espana/documentos/5220.pdf). En: VV.aa., Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. 68 p.
- Torres-García, M. T., Salinas-Bonillo, M. J., Gázquez-Sánchez, F., Fernández-Cortés, A., Querejeta, J. I. y Cabello, J. (2021). Squandering water in drylands: the water-use strategy of the phreatophyte *Ziziphus lotus* in a groundwater-dependent ecosystem. *American Journal of Botany*, 108 (2): 1-13.
- Torsvik, V. y Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 240-245.
- Vitousek, P. M., Aber, J. D., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., Schlesinger, W. H. y Tilman, D. G. (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications*, 7: 737–750.
- Vitousek, P. M., Ladefoged, T. N., Kirch, P. V., Hartshorn, A. S., Graves, M. W., Hotchkiss, S. C., Tuljapurkar, S. y Chadwick, O. A. (2004). Soils, agriculture and society in precontact Hawaii. *Science*, 304: 1665-1669.
- Whitman, W., Coleman, D. y Wiebe, W. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6578–6583.
- Wu, H., Adams, J., Shi, Y., Li, Y., Song, X., Zhao, X., Chu, H. y Zhang, G. (2019). Depth-Dependent patterns of bacterial communities and assembly processes in a typical red soil critical zone. *Geomicrobiology Journal*, 37 (5): 201-212.
- Wymore, A., West, N., Maher, K., Sullivan, P., Harpold, A., Karwan, D., Marshall, J., Perdrial, J., Rempe, D. y Ma, L. (2017). Growing new generations of critical zone scientists. *Earth Surface Processes and Landforms*, 42 (14): 2498-2502.
- Yang, F., Chen, Q., Zhang, Q., Long, C., Jia, W. y Cheng, X. (2021). Keystone species affect the relationship between soil microbial diversity and ecosystem function under land use change in subtropical China. *Functional Ecology*, 0: 1-12.
- Yu, J. y Steinberger, Y. (2011). Vertical Distribution of Microbial Community Functionality under the Canopies of *Zygophyllum dumosum* and *Hammada scoparia* in the Negev Desert, Israel. *Microb. Ecol.*, 62: 218-227.
- Yuste, J. C., Fernandez-Gonzalez, A. J., Fernandez-Lopez, M., Ogaya, R., Penuelas, J., Sardans, J. y Lloret, F. (2014). Strong functional stability of soil microbial communities under semiarid Mediterranean conditions and subjected to long-term shifts in baseline precipitation. *Soil Biology & Biochemistry*, 69: 223-233.

- Zak, J. C., Sinsabaugh, R. y MacKay, W. P. (1995). Windows of opportunity in desert ecosystems: their implication to fungal community development. *Can. J. Bot.*, 73: S1407–S1414.
- Zak, J., Willig, M., Moorhead, D. y Wildman, H. (1994). Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 26: 1101-1108.
- Zeng, Q., Dong, H., Zhao, L. y Huang, Q. (2016). Preservation of organic matter in nontronite against iron redox cycling. *Am. Mineral.*, 101: 120-133.
- Zhang, Q., Wang, G. C., Sugiura, N., Utsumi, M., Zhang, Z. Y. y Yang, Y. N. (2014). Distribution of petroleum hydrocarbons in soils and the underlying unsaturated subsurface at an abandoned petrochemical site, North China. *Hydrol. Process.*, 28: 2185-2191.
- Zhu, Y., Gillings, M., Simonet, P., Stekel, D., Banwart, S. y Penuelas, J. (2017). Human dissemination of genes and microorganisms in Earth's Critical Zone. *Glob. Change Biol.*, 24 (4): 1-12.
- Zogg, G. P., Zak, D. R., Ringelberg, D. B., MacDonald, N. W., Pregitzer, K. S. y White., D. C. (1997). Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. *Soil Science Society of America Journal*, 61: 475-481.

Webgrafia

<http://www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/datosclimatologicos/valoresclimatologicos?l=63250&k=and>

<https://www.lifeadaptamed.eu/>

8. Anexos

8.1. Anexo I: Patrones de Distribución de la Materia Orgánica

Tabla 3. Media y desviación estándar del contenido de materia orgánica (%) de las zonas muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Punto de muestreo	Materia Orgánica (%)
1	$1,31 \pm 0,60$ a
2	$1,39 \pm 0,61$ a
3	$1,79 \pm 1,88$ abc
4	$1,26 \pm 0,58$ a
6	$2,16 \pm 1,12$ bc
7	$1,68 \pm 1,68$ abc
8	$2,51 \pm 1,63$ c
9	$1,76 \pm 1,21$ ab

Tabla 4. Media y desviación estándar del contenido de materia orgánica (%) de las profundidades muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Profundidad (m)	Materia Orgánica (%)
1	$2,00 \pm 0,80$ c
5	$1,47 \pm 1,29$ abc
10	$1,08 \pm 0,32$ a
15	$1,23 \pm 0,64$ ab
20	$1,59 \pm 1,69$ abc
25	$1,81 \pm 1,36$ bc
27	$1,83 \pm 0,78$ abcd
30	$1,80 \pm 1,19$ abc
34	$2,14 \pm 0,32$ abcd
35	$4,03 \pm 1,94$ e
40	$3,10 \pm 0,97$ de

8.2. Anexo II: Tablas de Diversidad y Actividad Funcional Microbiológica: Patrones Globales

Tabla 5. Media y desviación estándar de la riqueza de sustratos de las zonas muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Punto de muestreo	Riqueza de Sustratos
1	10,44 ± 3,42 ab
2	8,54 ± 6,92 a
3	10,56 ± 5,18 ab
4	10,24 ± 2,05 ab
6	11,46 ± 1,77 b
7	11,17 ± 5,04 ab
8	8,90 ± 2,83 a
9	8,63 ± 2,20 a

Tabla 6. Media y desviación estándar de la riqueza de sustratos de las profundidades muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Profundidad (m)	Riqueza de Sustratos
1	14,08 ± 5,84 c
5	11,79 ± 4,37 b
10	8,71 ± 3,09 a
15	8,50 ± 1,62 a
20	7,81 ± 3,79 a
25	7,86 ± 2,97 a
27	9,83 ± 1,60 ab
30	9,08 ± 1,44 a
34	9,67 ± 1,53 ab
35	9,56 ± 1,42 ab
40	12,67 ± 4,03 bc

Tabla 7. Media y desviación estándar de la intensidad metabólica (AWCD) de las zonas muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Punto de muestreo	AWCD
1	0,22 ± 0,09 a
2	0,26 ± 0,26 a
3	0,25 ± 0,13 a
4	0,23 ± 0,05 a
6	0,34 ± 0,07 b
7	0,28 ± 0,16 ab
8	0,22 ± 0,12 a
9	0,21 ± 0,10 a

Tabla 8. Media y desviación estándar de la intensidad metabólica (AWCD) de las profundidades muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Profundidad (m)	AWCD
1	0,35 ± 0,23 d
5	0,29 ± 0,15 bcd
10	0,21 ± 0,11 a
15	0,22 ± 0,05 a
20	0,18 ± 0,12 a
25	0,19 ± 0,09 a
27	0,19 ± 0,04 ab
30	0,23 ± 0,08 abc
34	0,38 ± 0,02 abcd
35	0,27 ± 0,09 cd
40	0,34 ± 0,09 cd

Tabla 9. Media y desviación estándar de la diversidad funcional (H) de las zonas muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Punto de muestreo	H
1	$2,32 \pm 0,22$ bc
2	$2,10 \pm 0,48$ a
3	$2,32 \pm 0,51$ bc
4	$2,34 \pm 0,15$ bc
6	$2,42 \pm 0,14$ c
7	$2,33 \pm 0,33$ abc
8	$2,24 \pm 0,28$ abc
9	$2,20 \pm 0,22$ ab

Tabla 10. Media y desviación estándar de la diversidad funcional (H) de las profundidades muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Profundidad (m)	H
1	$2,54 \pm 0,36$ c
5	$2,46 \pm 0,33$ bc
10	$2,21 \pm 0,29$ a
15	$2,14 \pm 0,15$ a
20	$2,13 \pm 0,41$ a
25	$2,14 \pm 0,37$ a
27	$2,32 \pm 0,13$ abc
30	$2,20 \pm 0,15$ a
34	$2,26 \pm 0,03$ abc
35	$2,25 \pm 0,20$ ab
40	$2,55 \pm 0,27$ bc

Tabla 11. Media y desviación estándar del índice de Equidad (E) de las zonas muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Punto de muestreo	E
1	1,01 ± 0,05 a
2	1,03 ± 0,40 a
3	1,12 ± 0,47 a
4	1,02 ± 0,05 a
6	0,99 ± 0,02 a
7	1,00 ± 0,05 a
8	1,07 ± 0,16 a
9	1,04 ± 0,05 a

Tabla 12. Media y desviación estándar del índice de Equidad (E) de las profundidades muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Profundidad (m)	E
1	0,99 ± 0,06 a
5	1,05 ± 0,16 ab
10	1,06 ± 0,13 ab
15	1,01 ± 0,05 a
20	0,99 ± 0,40 a
25	1,17 ± 0,52 b
27	1,02 ± 0,02 ab
30	1,00 ± 0,03 ab
34	1,00 ± 0,07 ab
35	1,00 ± 0,03 ab
40	1,03 ± 0,06 ab

Tabla 13. Media y desviación estándar de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono ácidos carboxílicos de las zonas muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Punto de muestreo	SAWCD Ácidos Carboxílicos
1	0,32 ± 0,07 a
2	0,34 ± 0,29 a
3	0,33 ± 0,19 a
4	0,35 ± 0,11 a
6	0,58 ± 0,10 b
7	0,40 ± 0,23 a
8	0,31 ± 0,19 a
9	0,37 ± 0,16 a

Tabla 14. Media y desviación estándar de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono ácidos carboxílicos de las profundidades muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Profundidad (m)	SAWCD Ácidos Carboxílicos
1	0,41 ± 0,19 cde
5	0,40 ± 0,26 bcde
10	0,30 ± 0,17 ab
15	0,36 ± 0,12 abc
20	0,29 ± 0,19 a
25	0,33 ± 0,19 abc
27	0,33 ± 0,05 abcd
30	0,42 ± 0,18 bcde
34	0,70 ± 0,05 f
35	0,51 ± 0,16 def
40	0,56 ± 0,05 ef

Tabla 15. Media y desviación estándar de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono carbohidratos de las zonas muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Punto de muestreo	SAWCD Carbohidratos
1	0,20 ± 0,22 ab
2	0,25 ± 0,44 b
3	0,17 ± 0,14 bc
4	0,14 ± 0,06 ab
6	0,26 ± 0,21 b
7	0,20 ± 0,15 ab
8	0,19 ± 0,19 ab
9	0,11 ± 0,19 a

Tabla 16. Media y desviación estándar de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono carbohidratos de las profundidades muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Profundidad (m)	SAWCD Carbohidratos
1	0,41 ± 0,43 c
5	0,24 ± 0,22 b
10	0,17 ± 0,19 ab
15	0,12 ± 0,08 ab
20	0,12 ± 0,18 ab
25	0,10 ± 0,09 a
27	0,15 ± 0,12 ab
30	0,11 ± 0,04 ab
34	0,19 ± 0,02 abc
35	0,11 ± 0,07 ab
40	0,24 ± 0,19 abc

Tabla 17. Media y desviación estándar de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono aminoácidos de las zonas muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Punto de muestreo	SAWCD Aminoácidos
1	0,14 ± 0,12 ab
2	0,16 ± 0,17 abcd
3	0,22 ± 0,13 cd
4	0,16 ± 0,06 abc
6	0,19 ± 0,05 bcd
7	0,24 ± 0,23 d
8	0,11 ± 0,08 a
9	0,13 ± 0,06 ab

Tabla 18. Media y desviación estándar de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono aminoácidos de las profundidades muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Profundidad (m)	SAWCD Aminoácidos
1	0,24 ± 0,18 c
5	0,24 ± 0,18 c
10	0,13 ± 0,05 ab
15	0,11 ± 0,06 a
20	0,13 ± 0,08 ab
25	0,14 ± 0,09 ab
27	0,10 ± 0,03 ab
30	0,15 ± 0,06 ab
34	0,24 ± 0,05 abc
35	0,18 ± 0,06 abc
40	0,21 ± 0,03 bc

Tabla 19. Media y desviación estándar de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono aminas de las zonas muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Punto de muestreo	SAWCD Aminas
1	0,02 ± 0,02 a
2	0,08 ± 0,15 ab
3	0,08 ± 0,14 ab
4	0,02 ± 0,06 a
6	0,02 ± 0,04 a
7	0,14 ± 0,24 b
8	0,02 ± 0,03 a
9	0,03 ± 0,07 a

Tabla 20. Media y desviación estándar de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono aminas de las profundidades muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Profundidad (m)	SAWCD Aminas
1	0,09 ± 0,16 b
5	0,16 ± 0,21 c
10	0,02 ± 0,03 a
15	0,01 ± 0,02 a
20	0,02 ± 0,04 a
25	0,02 ± 0,02 a
27	0,00 ± 0,00 ab
30	0,01 ± 0,02 a
34	0,07 ± 0,05 abc
35	0,03 ± 0,02 ab
40	0,02 ± 0,04 ab

Tabla 21. Media y desviación estándar de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono polímeros de las zonas muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Punto de muestreo	SAWCD Polímeros
1	$0,37 \pm 0,11$ a
2	$0,47 \pm 0,24$ ab
3	$0,52 \pm 0,25$ b
4	$0,53 \pm 0,09$ b
6	$0,67 \pm 0,14$ c
7	$0,52 \pm 0,17$ b
8	$0,47 \pm 0,20$ ab
9	$0,50 \pm 0,15$ b

Tabla 22. Media y desviación estándar de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono polímeros de las profundidades muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Profundidad (m)	SAWCD Polímeros
1	$0,50 \pm 0,19$ bcd
5	$0,51 \pm 0,12$ bcd
10	$0,47 \pm 0,18$ abc
15	$0,60 \pm 0,13$ de
20	$0,39 \pm 0,17$ a
25	$0,43 \pm 0,23$ ab
27	$0,39 \pm 0,05$ ab
30	$0,56 \pm 0,17$ cde
34	$0,83 \pm 0,05$ f
35	$0,65 \pm 0,23$ ef
40	$0,76 \pm 0,18$ f

Tabla 23. Media y desviación estándar de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono fenólicos de las zonas muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Punto de muestreo	SAWCD Fenólicos
1	0,04 ± 0,00 ab
2	0,04 ± 0,10 ab
3	0,02 ± 0,04 ab
4	0,01 ± 0,03 a
6	0,04 ± 0,06 ab
7	0,06 ± 0,12 b
8	0,01 ± 0,03 a
9	0,02 ± 0,06 ab

Tabla 24. Media y desviación estándar de la actividad metabólica (SAWCD) para la fuente de carbono fenólicos de las profundidades muestreadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la prueba post hoc (LSD).

Profundidad (m)	SAWCD Fenólicos
1	0,09 ± 0,13 c
5	0,06 ± 0,11 bc
10	0,00 ± 0,01 a
15	0,00 ± 0,01 a
20	0,02 ± 0,03 a
25	0,01 ± 0,03 a
27	0,00 ± 0,00 a
30	0,00 ± 0,01 a
34	0,00 ± 0,01 ab
35	0,03 ± 0,04 ab
40	0,04 ± 0,04 abc